分子生物学实验技术

〔美〕L. 戴维斯 等 编著

科 学 出 版 社

分子生物学实验技术

〔美〕L. 戴维斯 等 编著

姚志建 沈倍奋 刘亚霞 等译

中科院植物所图书馆
S0011799

科 学 出 版 社

1 9 9 0

25356

内 容 简 介

本书既简明扼要地介绍了有关分子生物学实验方法的理论，又详细叙述了各种常用方法的实际操作，并对实验中应注意的地方采用注释的方式提醒读者。全书分21章，除介绍分子生物学的基础知识外，还介绍了各种克隆载体和宿主，DNA、RNA 的制备和分析，基因文库的构建，DNA 转染技术，以及分子生物学实验室常规方法和特殊实验方法，同时也收入了同类书中没有的许多新方法、新技术。

本书适合从事分子生物学研究的人员使用，也可供生物学、医学和农业中其它专业的研究人员及高等院校有关专业的师生参考。

L. Davis et al.
METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY
Elsevier Science Publishing Co. Inc.
1986

分子生物学实验技术

〔美〕L. 戴维斯 等编著
姚志建 沈倍奋 刘亚霞 等译
责任编辑 吴瑰琦
科学出版社出版
北京东黄城根北街 16 号
邮政编码：100707
中国科学院印刷厂印刷
新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售
*
1990 年 5 月第 一 版 开本：787×1092 1/16
1990 年 5 月第一次印刷 印张：16
印数：0001—4 800 字数：362 000
ISBN 7-03-001596-7/Q · 239
定价：16.10 元

译 者 的 话

由于分子生物学技术本身不断发展并向生物学、医学、农学等各个学科和领域迅速渗透，使得关心分子生物学实验技术的人与日俱增。不仅从事这方面工作的科学家需要不断使自己的工作跟上技术的更新，而且新进入这一领域或是力图把分子生物学方法用到自己原有研究领域中去的科学家也希望尽快地掌握这一研究方法。他们都需要一本既能跟上时代的发展而又简明扼要的实验手册。我们认为 L. 戴维斯等编的《分子生物学实验技术》(Methods in Molecular Biology) 是为满足这一需要而编写的众多实验手册中比较成功的一本。

本书的特点在于：(1)所介绍的方法切实可行、由浅入深，对操作中易出现的疏忽之处还特别加以指明，使得任何人都易于依此书进行实际操作；(2)所介绍的方法中包括了当前一些最重要的进展，如 M13 克隆繁殖和顺序分析、电融合技术、转基因小鼠的培育等，这些都是在较早出版的实验手册［如《分子克隆操作指南》(Molecular Cloning)］中所未收入的；(3)本书虽是一本实验方法学手册，但编排合理、循序渐进，并专门用第 1 章和第 2 章系统地讨论了分子生物学方法的基本原理和各种实验方法在研究中所处的地位，因此，也不失为一本可系统了解分子生物学现状的参考书。

由于译者水平有限，敬请读者对书中错译之处给予指正。

译者

1987 年 5 月

前　　言

近年来，生物学革命的核心是遗传学技术的发展。这种发展不仅改变了生物学家的工作内容，也许更重要的是改变了他们的思想方法。此外，一种从未有过的景象——从事各种不同学科的科学家蜂拥而至，一起涌入这样一个狭小而又神秘的领域（分子遗传学家过去常常认为他们的学科是这样的），这些人学习和掌握了一点儿这方面的技术，就迫不及待地使用它们。凭借这样一种有力的新武器，他们开辟了广阔的新天地，有数不清的事情等待他们去做，去学习。戴维斯博士及他的同事为我们做了一件大好事。他们以一种既反映最新发展又通俗易懂的方式向我们介绍了分子生物学中最重要的实验方法，使人们知道要干这项工作需要掌握哪些知识。本书的作者都是有经验的科学家，他们在书中既讲述了原理又介绍了细节。剩下的就留待我们自己去做了。

P. 莱德

波士顿

（姚志建译　马立人校）

目　录

译者的话

前言

第 1 章　分子生物学的基础知识……1

第 2 章　分子生物学家的工具……4

第 3 章　分子生物学实验的总则及本书的使用说明……8

3-1　本书的用法……8

3-2　安全事项……10

3-3　分子生物学研究所需要的仪器设备……11

第 4 章　克隆繁殖载体和细菌细胞……15

4-1　pBR322……15

4-2　M13……16

4-3　pUC……18

4-4　λgt10……18

4-5　λgt11……21

4-6　EMBL3 和 EMBL4……21

4-7　Charon 28……21

4-8　细菌菌株……23

第 5 章　真核细胞 DNA 的制备……24

5-1　DNA 的快速制备法……24

5-2　制备真核细胞 DNA 的一般方法……25

5-3　从培养细胞和组织中制备 DNA……27

5-4　限制性内切酶及其应用……30

5-5　琼脂糖凝胶电泳……34

5-6　Southern 印迹……37

第 6 章　用标记的合成探针探测核酸……41

6-1　合成 DNA 探针的制备：总论……41

6-2　合成探针的末端标记……43

6-3　与 ^{32}P 末端标记合成探针的杂交……45

第 7 章　用质粒衍生的探针探测核酸……48

7-1　缺口翻译……48

7-2　DNA 杂交（Southern 印迹杂交）……50

第 8 章　质粒 DNA 的制备……53

8-1　细菌的转化……53

8-2　质粒 DNA 的制备：Triton-溶菌酶法……55

8-3　大规模碱裂解法：质粒的纯化……59

8-4　质粒的"微量制备"法……62

第9章 DNA 限制性片段的制备 …… 64
9-1 微型凝胶 …… 64
9-2 酶切后 DNA 片段的分析：琼脂糖凝胶电泳 …… 65
9-3 电洗脱 …… 67
9-4 DNA 限制性片段的聚丙烯酰胺凝胶电泳 …… 69
第10章 DNA的纯化 …… 72
10-1 DNA 的精胺纯化法 …… 72
10-2 DNA 的玻璃粉洗脱法 …… 73
10-3 提纯 DNA 的其它方法 …… 75
第11章 真核细胞 RNA 的制备和分析 …… 78
11-1 异硫氰酸胍法制备总 RNA …… 78
11-2 RNA 制备：微量法 …… 82
11-3 在寡(dT)纤维素上选择分离多聚(A^+)RNA …… 84
11-4 分离 RNA 的甲醛凝胶电泳和 Northern 印迹法 …… 87
11-5 标记探针与 DNA 或 RNA 样品的"点印迹"杂交 …… 90
11-6 探测 RNA 凝胶的一般注意点 …… 91
11-7 从克隆到质粒内的 DNA 中制备 RNA 探针 …… 92
第12章 从噬菌体克隆制备DNA …… 96
12-1 噬菌体的生长和制备 …… 96
12-2 从噬菌体中大量制备和纯化 DNA …… 98
第13章 真核基因组 DNA 的克隆繁殖 …… 102
13-1 从真核细胞基因组克隆繁殖 DNA：引言 …… 102
13-2 基因组 DNA 的制备：部分 *MboI* 消化法 …… 103
13-3 用于基因组克隆繁殖的噬菌体载体的制备 …… 106
13-4 基因组 DNA 连接到噬菌体臂上并包装形成文库 …… 110
13-5 包装好的文库的滴定和平板培养 …… 111
13-6 用放射性标记的探针筛选平板培养的文库 …… 113
13-7 文库的扩增 …… 117
第14章 cDNA 克隆繁殖到 λgt10 和 λgt11 中 …… 119
14-1 cDNA 克隆繁殖载体 λgt10 和 λgt11 的制备 …… 119
14-2 从真核细胞 mRNA 制取 cDNA 插入物 …… 123
14-3 cDNA 文库连接和包装进 λgt10 或 λgt11 臂 …… 130
14-4 λgt10 和 λgt11 包装插入物的接种和筛选 …… 131
14-5 从 λgt10 和 λgt11 cDNA 克隆中制备 DNA …… 135
第15章 亚克隆繁殖到质粒中 …… 138
15-1 亚克隆繁殖到质粒中的一般注意点 …… 138
15-2 为插入片段的亚克隆和连接准备 pBR322 质粒 …… 139
15-3 pBR322 菌落杂交 …… 142
15-4 亚克隆到 pUC 质粒中 …… 144
第16章 M13克隆繁殖和顺序分析 …… 147
16-1 M13 克隆繁殖和顺序分析：概要 …… 147
16-2 制备在特定限制性酶切位点克隆繁殖的插入物 …… 151

16-3 通过连续的 BAL31 外切酶缺失法经 M13 克隆繁殖法制备插入物 …… 153
16-4 M13 载体的制备和插入物与载体的连接 …… 157
16-5 M13 转化到 JM103 大肠杆菌宿主中 …… 159
16-6 用放射性标记探针筛选 M13 克隆,以选择待顺序分析的插入物 …… 161
16-7 顺序分析用的单链 M13DNA 的制备 …… 163
16-8 M13 克隆的单行筛选分析 …… 165
16-9 聚丙烯酰胺顺序分析凝胶的准备 …… 167
16-10 M13 克隆的顺序分析 …… 170
第 17 章 克隆 DNA 的进一步鉴定 …… 175
17-1 S1 核酸酶保护性试验 …… 175
第 18 章 对培养的哺乳动物细胞的转染 …… 183
18-1 贴壁和非贴壁细胞用提纯的质粒经磷酸钙法转染 …… 183
18-2 DEAE-右旋糖酐介导的非贴壁和贴壁哺乳动物细胞的转染 …… 185
18-3 电融合(电击穿技术) …… 187
18-4 选择转化的哺乳动物细胞: G418 法 …… 189
18-5 氯霉素乙酰基转化酶 (CAT) 试验 …… 190
第 19 章 蛋白质方法 …… 193
19-1 体外翻译和免疫沉淀 …… 193
19-2 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质 …… 196
19-3 蛋白质印迹法 …… 199
19-4 凝胶电泳的蛋白质或 RNA 的银染法 …… 202
第 20 章 常规方法 …… 205
20-1 DNA/RNA 抽提和沉淀 …… 205
20-2 塑料袋的密封 …… 207
20-3 光密度测定 …… 209
20-4 凝胶照相或放射性自显影 …… 210
20-5 放射自显影术 …… 211
20-6 细菌培养平板的制备 …… 212
20-7 噬菌体的滴定和铺板 …… 214
第 21 章 特殊实验方法 …… 216
21-1 转基因小鼠的培育 …… 216
21-2 单克隆抗体的产生: 杂交瘤融合 …… 222
21-3 标记探针在组织切片上的原位杂交 …… 227
21-4 在酵母中进行克隆繁殖 …… 231
附录 …… 233
I. 贮存液 …… 233
II. 酶 …… 239
III. 试剂和设备的制造厂商 …… 240

第1章　分子生物学的基础知识

由于最近15年内发展了一系列新的研究技术，现代的生物科学已经发生了一场革命。这些技术使得与一系列复杂过程有关的分子机制和结构得以阐明，如细胞的生长、分裂、代谢、分化和发育。更有意义的是，它们提供了能够操纵对这些过程起关键作用的分子的方法，并且得以观察这些改造过的分子参入到活体系统中去以后所发生的变化。

核酸和蛋白质是大分子，是由亚单位组成的线性聚合物。核酸编码遗传信息，这种信息将决定有机体的全部蛋白质的一级结构。它们与类脂和细胞外的支持基质一起产生细胞的活性和生理功能。因此，通过检查这些关键化合物之间的相互关系，可以部分地了解生物的功能。细胞的遗传物质——脱氧核糖核酸(DNA)，是由4种核苷酸构成的聚合物。4种核苷酸的任何一种都是由一个碱基(A：腺嘌呤，G：鸟嘌呤，T：胸腺嘧啶，C：胞嘧啶)、一个脱氧核糖和一个磷酸酯组成的。每一股链都是由以磷酸酯共价相连的核苷酸所组成的，每个核苷酸都以其脱氧核糖的5′位碳与相邻的核苷酸的3′位碳相连。这种DNA的亚单位对糖磷酸盐骨架来说，两条链是以呈相反极性的反平行的形式存在，并彼此相绕成双螺旋的结构。由于一条链上的特定碱基与相对的(或互补的)链上的碱基间有形成氢键的倾向，这就使一条链与另一条链牢固地结合在一起。腺嘌呤总是与胸腺嘧啶配对，鸟嘌呤总是与胞嘧啶配对。碱基配对的精确性已通过核酸合成方法得到证实，即当一条新的链在加长时，仅仅由模板所决定的“正确的”碱基才能被加上去。正由于这种碱基互补配对的恒定性与专一性，才使DNA具有遗传信息贮存库的功能。核苷酸在DNA中的次序相应于氨基酸在蛋白质中的次序。这样，DNA可为蛋白质编码，方法是以其3个相邻的核苷酸为一组来编排一个mRNA密码子，后者又决定一个特定的氨基酸。因此，在DNA中核苷酸的线性顺序决定了对细胞结构、功能和酶蛋白至关重要的氨基酸顺序。DNA中不直接编码蛋白质的区域则含有调节基因产物合成的信息。

处于DNA和蛋白质合成途径之间的是核糖核酸(RNA)。双链DNA中含编码蛋白质顺序信息的那条链被复制或转录成互补的RNA链。此RNA含有与DNA中一样的碱基，但尿嘧啶(U)代替了T，而且核糖代替了脱氧核糖。基因的RNA复本叫作信使RNA(mRNA)，它在转移RNA(tRNA)和核蛋白体(rRNA及有关蛋白质)的帮助下被翻译成氨基酸，并依次将它们装配成蛋白质的一级结构。

很多分子生物学实验方法利用了原核细胞系统(如细菌)相对简单的优点。在原核生物中，连续的线性DNA顺序直接对应于RNA的线性顺序和蛋白质顺序。但是，在真核细胞中，对蛋白质编码的DNA不能连续阅读，因为在可翻译的顺序中间含有中断的地方(内含子)。因此，真核细胞DNA首先复制成初级转录本(异质核RNA)，然后在核中加工，切下编码蛋白质的顺序(外显子)。外显子线性连接构成成熟mRNA，后者在核中进一步加工并移入细胞质中翻译成蛋白质。一些较新的方法可用于研究真核细胞系统中的基因。

为了了解生物系统，有必要弄清基因的结构、功能和调节，以及它们的产物，这也涉及

到了解有机体中核酸的结构。由于真核细胞中基因组成的复杂性，以前要做到这一点十分困难，因为真核细胞中的 50 000 个基因中含有的核苷酸高达 10^9。为了分析基因的结构及在这一复杂条件下发生的事件，必须有能力分离出纯的单个基因来进行研究。DNA 的分子克隆繁殖提供了由众多的基因中分离出单个 DNA 片段的手段，并可将这一片段纯化到均一的程度，再将这一片段增殖以产生足够的纯物质，用于进行化学、遗传学和生物学的分析。在实验室里克隆繁殖过程完全依赖酶反应，使用充分鉴定过的细菌的 DNA 切割酶(限制性内切酶，RE)和修饰酶进行复制、切断和拼接分离的 DNA 分子。DNA 分子拼接到能独立进行复制的环形 DNA (质粒)或细菌病毒(噬菌体)中，然后引入到细菌细胞。当多次复制后，再把杂种分子分离出来并纯化，得到足够数量的 DNA 克隆片段。

分离纯化出 DNA 片段后，就能很快地测定核苷酸顺序，并由此可预测出它所编码的蛋白质的氨基酸顺序。将这种提纯的 DNA 用放射性同位素标记，科学家就能在复杂的细胞基因组中或有关的细胞内 mRNA 中，在高达 100 万种无关顺序的本底上探测到有关 DNA 顺序的复本。在每个细胞仅有 1—10 个复本的情况下，可以定性和定量地测出由纯化的 DNA 合成的 mRNA。

克隆 DNA 在细菌或酵母中再进行的基因操作可能表达它所编码的蛋白质顺序，提供在生物学或医学上有重要用途的蛋白质的廉价而丰富的来源，这是其它方法无法得到的。在实验室里通过改变结构或顺序还能产生克隆 DNA 的另一些形式，这些 DNA 可再引入细胞或整个动物中，用来研究这种人为的改变或突变所造成的结果，并更全面地了解基因的结构和调控。

在这本书中，我们叙述了分子遗传学中进行这些实验的方法。每一章中像“烹调书”那样一步步地加以介绍，所写的方法都已经被应用并有很好的结果。

本书收入的方法，从简单到复杂，范围很广。首先，描述了质粒和载体系统及细菌宿主细胞的使用。在开始的几章中假设已经有了某一合成的或克隆的 DNA 探针，可以进一步对感兴趣的基因进行筛选、扩增和鉴定。第 5 章讨论由组织中分离 DNA，将 DNA 切到合用的大小并根据 DNA 片段的大小对其进行分离。第 6 章和第 7 章提供了用合成或从质粒衍生的方法制备探针，用来筛选感兴趣的 DNA。制备和扩增质粒的方法收入第 8 章。第 9 章和第10章则讨论由扩增的质粒中，切出并提纯被克隆的 DNA。

第 11 章的内容转向 RNA——它的制备、选择、分离和分析。第 12 章记叙了另一类型的克隆繁殖载体——噬菌体。到现在为止所讨论的方法都涉及到已被克隆的 DNA 顺序的选择和扩增。第13章和第 14 章，收入了以噬菌体为载体建立基因组和 cDNA 基因文库的方法。

从构建好的基因文库可选择出想要的克隆。随后，在第 15 章里叙述了将这种 DNA 再克隆到质粒中进行制备性的生长以获取大量的该种 DNA。由于这样克隆的 DNA 有较高的产量，将它们克隆到合适的 M13 载体中以后，能用于进行顺序分析及其它方面的研究 (第 16 章和 17 章)。以上我们是利用较简单的原核系统的优点对 DNA 进行研究的。但是，将克隆的基因的变异形式送回真核细胞的基因组中，以便在生物学意义上更相关的系统中评价它的功能和调节是很重要的。第 18 章描述了将 DNA 参入到培养的哺乳动物细胞中的方法。

如上所述，蛋白质是遗传物质的产物，为了了解基因的调节而对其进行研究可能是重要的。而且在体外将 RNA 翻译成蛋白质也是可能的。这些与蛋白质有关的方法将在第 19 章讨论。

第 20 章介绍一般方法，描述了一些基本技术，实际上它们已被结合进本书讨论的许多方法之中，如 DNA 抽提、放射自显影和空斑效价滴定。对于新手来说，可在开始时先参阅这些方法，必要时就会很自然地再想到它们。

最后，将一些较为特殊的分子生物学方法收入第 21 章。在这一章里首先讨论了基因转移小鼠的分析，这涉及到将新的基因片断引入小鼠胚胎以对产后的动物进行分析。我们也记叙了制造单克隆抗体的技术，它们可用于制作特定基因产物的免疫学探针，以及用于原位杂交，即用核苷酸探针在组织切片中定位和研究特定的遗传信息。最后谈到了在分子生物学技术中用酵母做为宿主及其载体系统时要注意的一些事项。

下面的几页将介绍这些特殊技术在分子生物学研究中的应用，特别强调了那些在应用这些方法时可能遇到的问题。

（姚志建译　沈倍奋校）

第2章　分子生物学家的工具

为了对分子生物学方法有一个总的了解，本章将讨论应用多种方法来对某一个典型的基因X做系列实验研究的一种可能性。

也许人们对X基因的研究是想了解它的重要结构或它在某种生物体系中的表达，这就先要得到一个带放射性标记的 DNA 探针，它有与X基因相似的顺序，例如从另一物种(与X基因同源)得到的基因。这个探针将被提纯并通过缺口翻译来做成带放射性标记的用来在 DNA 印迹分析中测出X基因的存在。另一种方法是，可在实验室中合成一个寡探针，核苷酸探针，这段寡核苷酸含有一段与X基因的某一部分互补的顺序。然后，把这种探针用于 DNA 印迹分析，分析从组织或用 DNA 印迹法选出的细胞系的 DNA，以确定与X基因有关的顺序在基因组中的存在。

DNA 印迹法的做法是：由组织或细胞系中分离 DNA 并提纯，用特定的限制性内切酶切成一定的片段，然后用琼脂糖凝胶电泳按 DNA 片段的大小来把它们分成若干条带，再把凝胶上的 DNA 转移到硝酸纤维滤膜上(Southern 印迹法)，然后与对X基因有特异性的探针进行杂交(Southern 杂交)。探针仅与含有同源顺序的内切酶酶切片段形成互补的碱基对。洗脱非特异性的放射性，此时如有X基因存在，可在印迹的放射自显影图上见到一条或几条带，如果在测试的 DNA 中无X基因，则见不到这样的带纹。

如果从某一特定组织样品中得到的 DNA，它的核酸内切酶酶切片段 Southern 印迹杂交图发生改变，则说明X基因结构顺序有了变化。例如，如果在某一特定组织或肿瘤中出现了 DNA 的重排，则这种“体细胞”的重排就可以用探针与不同来源组织中提取的 DNA 杂交来加以鉴定。不同类型细胞或组织的基因组 DNA 由于重排引起的变化，在 DNA 印迹中可能显示不同大小的杂交片段。

限制性酶切片段长度的多态性(RELP)或不同基因类型(等位基因)可能是使DNA图形改变的另一类例子。如果从100个个体中得到的基因组 DNA 用内切酶 *Eco*RI 作用并在 Southern 印迹法中用X基因的探针进行探测，这时有可能得到2个或多个不同的亚群。例如，有些个体的基因组 DNA 中可能含有10kb的杂交限制性内切酶酶切片段，另一些个体则含有6kb的杂交片段，杂合子的个体则可能同时含有10kb和6kb的片段，这就表明在所研究的群体中X基因所在的座位上有两种不同的等位基因。这类 RFLP 当中的一部分可能与遗传性疾病或恶变的倾向有关。这样就能确立X基因特异性等位基因与遗传性疾病或肿瘤发展之间的关系。Southern 印迹的研究也就因此可测定出疾病发展的可能性。最近已经证实与 Huntington 病、Duchenne 重症肌无力和囊性纤维性变有关的 RELP 的遗传学因素，使得可对易感的个体在他们未达到生育年龄前就被查出，甚至在他们出生前就能被查知。

为了了解X基因的详细结构或在不同的生物学条件下X基因的变异结构，人们需要大量X基因同源制品。基因组文库的建立是通过随机地收集基因组的各个片段，它们包括基因组中的所有区域，每个区域最少也要有一个复本。将这些片断分别插入到有自主

复制能力的原核 DNA 中或载体中，如 λ 噬菌体的衍生物。将重组体的基因文库中的各个成员都用来感染细菌细胞。这些细胞将分裂多次，每个细胞中都含有带有插入物的噬菌体的多个复本。在大多数情况下，至少有一些克隆片段含有X基因。用上面所描述的探针可从基因组文库中分离出含X基因的克隆。

这样，就建立了克隆基因片段的噬菌体文库，在此文库中的约100万种噬菌体将分别产生多个它们特有的插入 DNA 片段的复本。为了找出在此文库中那些能复制X基因的噬菌体，就必须对整个的文库进行筛选。筛选的方法是：将整个文库接种在培养皿上，把每个噬菌斑中的一小部分 DNA 转移到硝酸纤维滤膜上，同时用对X基因有特异性的探针在滤膜上进行杂交，然后进行放射自显影，最后在X线片上找出杂交 DNA 形成的黑斑点。任何通过自显影显出的斑点均表示X基因或与X有关顺序的噬菌体克隆，然后可分离和进一步提纯。几轮筛选后，就有可能挑出均一的X基因的克隆。此时，该样品只含有一种类型的插入了X基因的噬菌体。可用内切酶将带有X基因的片段从噬菌体基因组中切出，并再插入到更为紧凑的载体，如质粒。将感兴趣的 DNA 插入到质粒中去以后，就能以制备规模进行大量的扩增，制造出以 mg 计量的X基因，以便于进一步研究。

用基因组 DNA 克隆，有可能找出X基因结构上的界线并测定其核苷酸的顺序。例如，X基因可被不同的内切酶去切割，根据酶切图谱定位X基因内及周围的酶切位点(酶切位点对一小段特定的 DNA 顺序是高度专一的)。做法是：将X基因 DNA 用数种内切酶联合消化，并将消化的样品在琼脂糖凝胶上进行电泳。比较数种内切酶联合消化及分别消化所产生的片段的大小，将能得到基因组 DNA 克隆的限制性内切酶酶切位点图谱。

有了X基因的酶切位点图谱，就能制备出来自X基因的 DNA 小片段并把它克隆到 M13 噬菌体载体中去。这些片段可以用双脱氧链终止法或化学降解法来进行顺序分析。由这些顺序有可能得到X基因上编码区(外显子)和非编码区(内含子)的情况，也可鉴定已知的调节区段。将此顺序与通用的遗传密码加以比较，可推测出X基因所编码的氨基酸顺序。

同一种检测X基因的标记探针还可用来从感兴趣的真核细胞中寻找 RNA，以便更好地了解X基因是如何表达的。从细胞中分离和提纯出 RNA，并通过mRNA 顺序中 3′ 端所含的一串腺嘌呤碱基(poly A 结尾)与 oligo-dt 柱的特异性结合，将 mRNA 从 rRNA 和 tRNA 中提纯出来。这些 mRNA 然后可在变性的琼脂糖凝胶中按大小进行划分，通过印迹法(Northern blot)转移到硝酸纤维膜上，并用一种与X基因同源的探针对印迹进行杂交。这些实验不但显示出X基因转录产物的大小，也可以显示出不同组织之间X基因的相对表达量。利用这一方法，人们可追踪X基因在不同时间、不同组织中的表达情况，或某一诱导剂或抑制剂的调节作用。还可通过 Northern 印迹法测定出作为X基因产物的成熟 mRNA 或 mRNA 前体的大小。

如果X基因的蛋白质产物被鉴定出来，则有更多的方法可用于研究这种基因。该基因产物的抗体能用来作为探针。因此，为确定由X基因得到的 mRNA 是不是翻译作用的合适底物，可在体外把这种 mRNA 翻译成为蛋白质产物，并用合适的单克隆或多克隆抗体或是有功能的生物学试验去分析这种蛋白质。用一种类似于 DNA 或 RNA 印迹的方法，蛋白质产物可在聚丙烯酰胺凝胶电泳上按大小分开，并被转移到硝酸纤维膜上，用

抗体来进行鉴定(Western 印迹分析)。

利用 S1 核酸酶保护作用定位法可对 X 基因转录的 RNA 进行更深入的分析。在这一方法中，mRNA 与 ^{32}P 标记的、对 X 基因特异的单链 DNA 探针杂交。将 RNA-DNA(杂合双链)结构用核酸酶 S1 消化，这种酶仅对单链 DNA 有特异性作用，它将消化掉因为碱基没有配对而不受保护的 ^{32}P 标记的单链 DNA 区。然后，在变性的凝胶上，按大小分离不为 S1 作用的 DNA 双链区段，并用放射自显影显示结果。用 X 基因克隆的片段做为探针去与转录的 mRNA 杂交，内含子区与外显子区可被精确的测定。这种分析也提供关于 X 基因的 5′ 与 3′ 末端区域在基因组中定位的信息。

X 基因的 RNA 转录本的明确的结构分析有可能通过收集互补 DNA(cDNA)克隆而得到，这种 cDNA 是由在能表达该基因的细胞或组织中的 mRNA 制得的。这些克隆通常是由 cDNA 文库中分离出的，文库中含有来自某种特定细胞或组织的 mRNA 的代表性样品。为了由细胞或组织的 mRNA 中建立 cDNA 文库，要用依赖 RNA 的 DNA 聚合酶——AMV(鸟类成髓细胞性白血病病毒)反转录酶来转录 mRNA 的 cDNA 复本。然后再用 RNase H 和 DNA 聚合酶 I 去形成 DNA 双螺旋。将这种双链的 DNA 嵌入到合适的噬菌体克隆繁殖载体(λgt10 和 λgt11)中，使每个重组的噬菌体含有来自单个 mRNA 分子的一个 cDNA 复本。来自 X 基因的 cDNA 克隆可用 X 特异的探针去杂交以进行分离，其方法非常类似于用于基因组克隆的方法。通过对来自 cDNA 克隆的和基因组等位基因的核苷酸顺序与核酸内切酶图谱的比较，可精确地查出所有的结构改变及编码区的界线。

同样的 cDNA 文库可用于获得某一基因的原始克隆(progenitor clone)。即如果当被编码的蛋白质的部分氨基酸顺序已知时，可根据其中的一段区域推测出核苷酸顺序并合成这段顺序的寡核苷酸杂交探针，利用它选择出这些原始克隆。另一方法是通过蛋白质融合载体系统，例如 λgt11 建立 cDNA 文库。在这种克隆繁殖载体中，双链 cDNA 插入到 β-半乳糖苷酶基因的羧基端。如果 cDNA 顺序以合适的翻译解读框并以合适的方向(6次中有 1 次)插入，这一重组噬菌体就将合成一种 β-半乳糖苷酶的融合蛋白，其羧基端的氨基酸顺序是由克隆的 cDNA 插入物所决定的。这样制成的 cDNA 克隆可用所感兴趣的那个蛋白质的抗血清来进行筛选。制造这种融合蛋白的克隆将与抗血清发生阳性反应，而能被筛选和提纯到均一的程度。

现在 X 基因的结构及表达的性质已被测出了，有可能用 DNA 转化技术将此基因重新插入到哺乳动物的基因组中去。这一类型的实验可用于分析和确定在顺序上与该基因相邻的调节片段。如果将 X 基因的变异结构插入到培养细胞中去，将能进一步测试这些调节顺序的功能。除了通过研究 X 基因的产物来了解调控作用外，也有可能探查由于插入和改变基因的表达所造成的宿主细胞的表型改变。

对引入基因小鼠的分析是这一方法学重要的扩展。做法是：将 X 基因的 DNA 通过显微注射转移到小鼠的受精卵中去。把带有插入DNA 的胚胎植入到代孕母鼠(pseudopregnant mother)体内，并分析其后代。由这种基因植入小鼠得到的基因组 DNA，可检查 X 基因在种系中整合的稳定性。用这样的克隆基因植入小鼠，也能研究基因表达的调节及基因对宿主动物的作用。用此方法，将有可能在各种不同的宿主细胞中(也即不同的组织)研究一个单基因，这是用细胞培养技术很难达到的。此外，还可用于了解组织特异和

发育阶段特异的基因调节片段，并在整体动物中研究它们的性质。

本书中收入的技术为系统地研究哺乳动物基因表达打下了基础。这些方法并非总是轻而易举就能掌握的，但一旦被掌握，它们就会成为研究工作者探索生物系统功能的有力工具。这些方法包括从简单的 DNA 分离到将外来的 DNA 植入宿主动物的基因组的实际操作；也包括从简单的实验室方法到高度复杂并仍在发展中的技术。使用这些方法，有可能确定某些疾病、生理反应、生化机制及细胞活动的遗传基础。这些方法又能用来生产生物技术产品，包括新的高效的治疗药物、新的诊断药盒和其它各种有价值的生物医学产品。

（姚志建译　沈倍奋校）

第3章　分子生物学实验的总则及本书的使用说明

3-1　本书的用法

使用本书的人将包括已在从事分子生物学研究的科学家，以及第一次用这些实验方法的学生和科学家。本节的内容可以帮助初学者了解怎样开始他们新的工作。对于专家来说，先读读下面的几页也是有益的，这可使他们熟悉本书中使用的术语。

本书中收入的内容包括实验室工作的标准技术，以及较新的方法，这些方法的重要性正在得到越来越多的证明。为了使本书的篇幅更为合理，某些问题将集中起来描述。因此，每一种方法的设计虽然尽可能是完整的，但当您要完整地了解一种技术时，也许要由本书中的其它章节里获取必要的信息。例如，一半以上的方法需要抽提和沉淀 DNA 或 RNA。我们在书中收入了一个 SS-苯酚/氯仿抽提 DNA 或 RNA，接着用乙醇沉淀的通用方法，对这样一种方法，可能并不在每项技术中都再详细地描述了，如有必要，可参阅 20-1。

此外，在每一特定方法中并未全部列出每一种缓冲液的配方。注意每个方法的"试剂"部分所包括的某些缓冲液或溶液的名称是用斜体(中文用楷体)或黑体字表示的。斜体(中文用楷体)表示贮存液，其组成可由附录 I 中查到，黑体则为贮存液的稀释液。再请注意：乙醇的含义是指 95% 的乙醇或无水乙醇，H_2O 是指蒸馏水或去离子水。除非另有说明，一切离心都是指在室温下进行的。对上述表达方式的任何变更都将在文中注明。建议您在实践任何技术以前，先参阅"试剂"部分，并预先配好所有的试剂。

某些试剂和设备的供应厂商在文中的各处都用括号注明并列于附录 III。由于大小供应厂商不断地增加，把它们都罗列出来是不可能的。如果列入的供应厂商不止一家，则列于第一位的厂家产品是我们所使用的，并且效果也比较好。请记住不一定要原样照搬，每位使用者都必须找出满足某一特定目的的最好的供应来源。再者，质量和服务可能随时间而改变。科学家在为某一目的而选用供应来源时要注意许多方面，如可靠性、服务水平、质量、价格、地区及负责的程度等。

所有的方法都写成分步骤的操作程序，因为它们已经成功地用于我们的实验室。大多数方法都有多种变更的形式，而收入本书的只是其中我们使用时效果最好的。对于试用过本书中某些方法的人来说，他们知道要想很好地使用一种方法，经常需要克服某些障碍。只要可能，我们将谈到解决问题的窍门，以及错误发生后如何去弥补修正。因为想面面俱到地重复某一方法是不可能的(例如，要用同样的装备、供应厂商、试剂批号、水的供应等)，所以我们力图指出最易出现毛病的地方或不应该改变的最重要之处。这些方法对我们的工作大为有用，也希望它们能在不大改动的条件下为您提供便利。

当开始应用这些技术时，可能碰到的主要问题是溶液等的污染。防止污染的最好方

法有两个：确实保证实验用水是相当纯净的(并始终用这种水)；在每一项操作中都戴上外科或实验室用的手套。

每一方法都附有参考文献。在大多数情况下，它们是原始的参考文献，并且是这一方法发展的起点。对收入的大多数方法来说都有过许多发展阶段，对其现阶段的状况可能还没有文献可供利用。

大多数方法都附有注释，其中含有重要的附加信息。在任何操作之前，从头至尾地阅读整个方法(包括注释)，将会大有好处。

最后，应该注意到在某些情况下这些方法具有通用性。它可用于某一特定的组织或细胞，也许只需要稍加修正就能用于另外的组织或细胞。一旦某些技术在实验室中被建立，它们就可能得到扩充或修正。

在许多技术中都会用到的一般方法

很多方法做为更为复杂技术的一部分而被反复使用。与其每当遇到它们时都详细加以描述，不如把它们作为通用性方法而单独列出。在对较大型的方法的叙述中，可参阅这些通用性方法(例如，“在微型凝胶上分析样品”可在 9-1 中找到对它的描述，而“从凝胶上电洗脱DNA”则可参阅 9-3。

下列方法是常用的，将分别加以描述：

限制性内切酶消化(5-4)

Southern 印迹法(5-6)

缺口翻译(7-1)

DNA 杂交(7-2)

细菌的转化(8-1)

微型凝胶(9-1)

电洗脱(9-3)

SS-苯酚抽提/乙醇沉淀(20-1)

光密度测定(20-3)

凝胶照相(20-4)

放射自显影(20-5)

细菌培养平板的制备(20-6)

噬菌体的效价测定及平板接种(20-7)

我们建议在做较复杂的方法前，先学习和做一做这些实验。无疑在很短的时间内您将熟悉这些常用的方法，而不必在复杂的试验中一遇到它们就又得参阅有关内容。

应用本手册时应知道的缩写和术语

在本手册中仅用了很少的缩写词。除了下面列出的以外，其它术语都是在大多数实验室中标准化的用语。如要全面了解分子生物学术语的词汇，请参阅分子生物学教科书。

A，T，G，C——核苷酸的碱基，依次是腺嘌呤、胸腺嘧啶、鸟嘌呤和胞嘧啶

bp——碱基对

印迹法——DNA、RNA 或蛋白质的转移，一般从凝胶转到固体支持物上，如硝酸纤维

素滤膜

dNTP——三磷酸脱氧核苷酸(如 dATP,dCTP)

ddNTP——三磷酸双脱氧核苷酸

乙醇——无水或95%乙醇

H_2O——纯水(去离子或蒸馏)

插入物——一段外源 DNA 顺序加入到噬菌体或质粒等载体中

kb——千碱基(1 000个核苷酸碱基)

NC——硝酸纤维素

N°——某一特定碱基限量的核苷酸混合物(如 G° 表示与少量G碱基混合)

O. D.——在一定波长读出的光密度(如在600nm处)

寡核苷酸——一小段 DNA 顺序(即少于 50 bp)

pfu——空斑形成单位

RE——限制性内切酶

U——酶活力单位

UV——紫外线

载体——可自主复制的克隆繁殖载体

厂商名称的简称,例如 BM、BRL、NEBL、P-L 等请参见附录。

下面的几页将涉及安全事项及仪器设备。

3-2 安全事项

实验室中安全是最重要的,而本书介绍的技术往往是有一定危险的。虽然某些有危险的地方在叙述方法中将予以指出，但不能把本书看作是一本安全手册，每个人必须了解所有的安全措施,并将实验室的操作置于最安全的条件下。对如何使用化学试剂、放射性试剂和生物学试剂而进行有关安全措施的全面讨论已超出本书的范围。下面提到的几点须格外留神:

有毒的化学试剂

在这些操作中所用的某些化学试剂是有毒的,需要倍加小心。许多溶剂，像氯仿、异戊醇、异丁醇、正丁醇、甲醛和乙醚,应在通风柜中使用，并注意保护衣服、皮肤和呼吸道。另一些试剂有可能是致癌物或诱变剂,像溴乙锭、甲酰胺,须在操作中注意防护。 此外由于上述及其它试剂的毒性,在实验室内绝不准许用口来吸吸管。 有关各种试剂安全使用的知识可由供应厂商提供,对他们的所有警告都必须小心对待。

放射性

有些实验需要使用 ^{32}P 或其它放射性物质。 确实保证遵守使用这类物质时的所有守则。对放射性废弃物也要同样小心。 研究所应该有管理放射性物质的规则。 必须熟知这些规则及操作放射性的步骤，包括发生溢漏时的处理。保证有合适的屏蔽，贮存和处理也要得当。总而言之，在操作放射性的整个期间都要密切注意它们的去向并妥善地处理。

生物学管制

您想用的某些微生物可能比一般实验台操作需要更为严格的控制。您必须知道这些要求并进行较高水平的管制。美国国家卫生研究院(NIH)在《重组体 DNA 研究的准则》中对各种实验提出了专门的建议。要了解地区性的或政府的关于控制生物技术操作的法令。当溢出发生时，要知道如何去除污染和灭菌。

设备方面的危险

在这些技术中所用的某些设备如操作不当可能会出现危险，特别是可能来自电泳电源的电击危险。因此，需要参阅仪器的说明书以了解安全措施。

对全部上述的内容，都可由试剂、放射性物质及设备的供应厂商处得到有关潜在的危险、毒性和安全管理的资料。同时，职业安全与健康署(OSHA)和读者所在的研究所也有关于使用大多数试剂时潜在危险的说明。研究工作者必须知道可能存在的全部危险，并知道如何安全地处理它们。

3-3 分子生物学研究所需要的仪器设备

本书中收入的实验需要多种仪器。好在其中的大部分都是许多生物化学和细胞生物学实验室中常备的。另一些设备是在特定的情况下使用的，它们在非分子生物学的实验室中一般见不到。

无法将全部用于分子生物学实验中的设备都列出来，下面列出的设备被认为是最重要的。

重要的普通设备

保温箱

几乎任何方法都少不了多次保温。能从一种温度调到另一温度是重要的，因此至少需要 2 台加热水浴锅。冷冻浴设备一般来说并非必要，只要有一个调到合适温度的冰桶即可满意地工作。同时，至少要有一台干燥箱(烘箱)和一台真空箱。某些培养箱还带有振荡、旋转和蜗动等能力，需有几台分别具有这些功能的培养箱或带有不同功能附件的培养箱。

细胞培养装置

环形振动装置和转鼓对于细胞培养是经常需要的。为避免细胞和反应器污染，需要大量无菌的一次性细胞培养器皿。需要一台 CO_2 孵箱，用来在 37℃ 培养哺乳动物细胞。需要一台细菌培养器。一台无菌的层流柜(超净工作台)对于哺乳动物细胞的工作是有用的，也许是必要的。为了研究某些重组体，BCL 2 或 BCL 3 水平的控制可能是必要的。为了观察细胞，需要一台倒置显微镜。

灭菌

一台高压消毒锅用来消毒在许多方法中都要用的灭菌溶液、玻璃器皿等。滤膜与滤

器(0.22μm)用来对溶液灭菌。紫外线、70% 乙醇及火焰用于仪器设备灭菌。

离心机

许多方法中都需要多次离心，因此，需要一台微型离心机、一台可用大试管的冷冻台式离心机、一台适用于多种大小离心管的落地式冷冻离心机和一台超离心机(要有角度转头、水平转头和悬挂转头)。在冷室中再有一台微型离心机会是很方便的。鉴于有些操作要长时间离心，每种类型的离心机最好能有几台。

冷冻

一台普通冰箱，一台 −20℃ 冰冻器(也可是冰箱的一部分)，还需要一台 −70℃ 冰箱。因为很多试剂要在 −20℃ 保存，再有一台 −20℃ 冰箱是有用的。为了进行反应和在 4℃ 离心，一间冷室是有用的。冰箱和低温冰箱里的空间总是十分有用，因为不论开始时冰箱容积如何宽裕，很快您就会感到它过分拥挤了。液氮、干冰和碎冰也是必要的。

安全

很多溶剂能逸出毒气，因此必须有通风柜。使用 ^{32}P 时需要有有机玻璃屏蔽。要有合适的贮存和废物管理系统。要使用大量塑料手套(根据特定的需要、所用的溶剂及个人的偏爱，手套的材料各不相同)。为了抓动物、使用干冰和玻璃器皿，也要有合适的手套。各研究所会有使用和管理动物、化学试剂和溶剂及放射性物质的规则。根据这些规则的内容，也许要有为贮存和操作而附加的特定装备和用品。

塑料器皿

在这些方法中要用多种不同大小的试管。最普遍的是 1.5ml 微量离心管、大约 10 和 15ml 的聚丙烯试管、同样大小的扣帽试管、无菌的螺帽试管(通常用于细胞培养)及各种高速离心管。还需要不同大小的一次性使用的瓶子、培养皿、微型滴定板、移液管头及其它各种与细胞培养有关的塑料器皿。

玻璃器皿

细胞培养用的大烧瓶(1—4L)和各种玻璃试剂瓶。用于进行反应和离心的厚壁试管(30ml Corex 试管)。各种普通实验室玻璃器皿(三角烧瓶、烧杯、量筒等)。所有用于 DNA 和 RNA 样品的玻璃器皿都要用酸洗并在用前灭菌。

放射性测量

对使用 ^{3}H、^{14}C、^{35}S 和 ^{32}P 放射性标记物的工作，需要有液闪计数器。对于监测操作 ^{32}P 标记的放射性物质及处理废物，盖革计数器是很有用的。

光学测量

对许多操作来说，紫外/可见分光光度计是必要的。折射计也有用，但非必需。紫外透射光源(302nm)可用于观察反应产物。当进行凝胶照相时，再有一台手提式紫外光源

更为方便。

普通实验室装置

pH 计、加热搅拌器、旋涡振荡器、称取试剂的天平、实验室计时钟、移液器和干燥器全都是需要的。梯度发生器和部分收集器是需要的。还要有真空、氮气、空气、CO_2 和 O_2 的供应。

水

高纯度的去离子水、蒸馏水的来源非常重要。注意本书所有步骤中提到水的地方都是指这样的纯水。某些操作中要求高压灭菌或自来水的地方都已加以说明。水的纯度不合格是潜在的问题来源。

专用设备

照相

给凝胶拍照的一台拍后即可冲洗出照片的波拉罗伊德（Polaroid）照相机是必要的，还要有一台带有长波紫外光源(约 302nm)的透照系统。

放射自显影

自显影曝光过程中常用装 X 线片的暗盒。冲洗 X 线片的系统是需要的，一台自动冲洗机会非常有用，但不是必需的。对这些操作来说显影增感屏是有用的。

电泳系统

至少两台包括电源及垂直胶、水平胶和微型胶的电泳系统是必要的。对某些操作来说，可提供大电流(400mA)或高电压(2 000V)的电源是必要的。在这些系统中还需要玻璃和塑料的平板、成型梳、垫片、夹子等。

滤膜

大张的 Whatman 3MM 滤纸，23cm 宽的滤纸卷及 20 × 20cm 的方块滤纸都是有用的。硝酸纤维素膜（NC）用于做琼脂板或凝胶的印迹。建议买现成的 20 × 20cm 及与 82mm 培养皿一样大小的圆形滤纸(某些新的滤膜，如尼龙筛可用来代替硝酸纤维膜，读者也许愿意一试)。还要准备用于过滤或闪烁计数的其它滤纸。

盘和皿

各种大小的塑料盘、皿，用来盛放、贮存凝胶和滤纸等物和在上面进行反应。可购买清洁的塑料盘。

特殊装备

当用硝酸纤维膜工作时，一台塑料袋热封口装置是很有用的。为了小体积的、放射性样品的工作和其它目的，各种注射器及小针头是需要的。小体积的移液管、定量配液或自

动配液的移液管是需要的。微波炉可使溶液加热更为方便，但非必要。需要一台干胶仪来干燥做顺序分析的胶，还需要一台真空干燥设备以干燥样品。为了基因转移小鼠的分析，尚需要一些特殊的仪器(20-1)。

自制的装备

可以自制一些设备，如电泳槽。有些设备如电融合器，可能还不易买到，因此也需自制。一般说来，随着分子生物学装备和试剂的供应厂商日益增多，这些设备也将会容易得到。

（姚志建译　沈倍奋校）

第 4 章　克隆繁殖载体和细菌细胞

4-1　pBR322

这是一个有 4 362bp 的双链 DNA 质粒克隆繁殖载体，利用它能够简便快速地制备克隆的重组 DNA 片段。它含有两个抗生素(四环素和氨苄青霉素)抗性基因、一个复制起点和许多对克隆繁殖或亚克隆繁殖的限制性片段有用的限制性位点。pBR327 除了在 1427 和 2516 之间的所有核苷酸缺失外，其余都与 pBR322 相同。删去这些顺序可缩小克隆繁殖载体，并且可以去除已被证实干扰克隆 DNA 在真核细胞表达的那些顺序。pBR327 仍含有两个抗生素抗性基因。按照惯例，第一位核苷酸是 *Eco*R1 识别位点 GAATTC 的第一个 T。pBR322 和由 pBR322 衍生的质粒是很常用的质粒载体。

当缺乏抗性基因的大肠杆菌转化成功时，这些质粒克隆繁殖载体能提供对抗生素的抗性。这两个抗生素抗性基因具有独特的用于 DNA 片段插入的克隆繁殖位点。用限制性内切酶打开质粒，插入一个与连接酶匹配的 DNA片段将使这个抗性基因失活。但是，选择可以通过将转化细胞生长和接种在另一种抗生素存在的条件下实现。例如，将克隆的

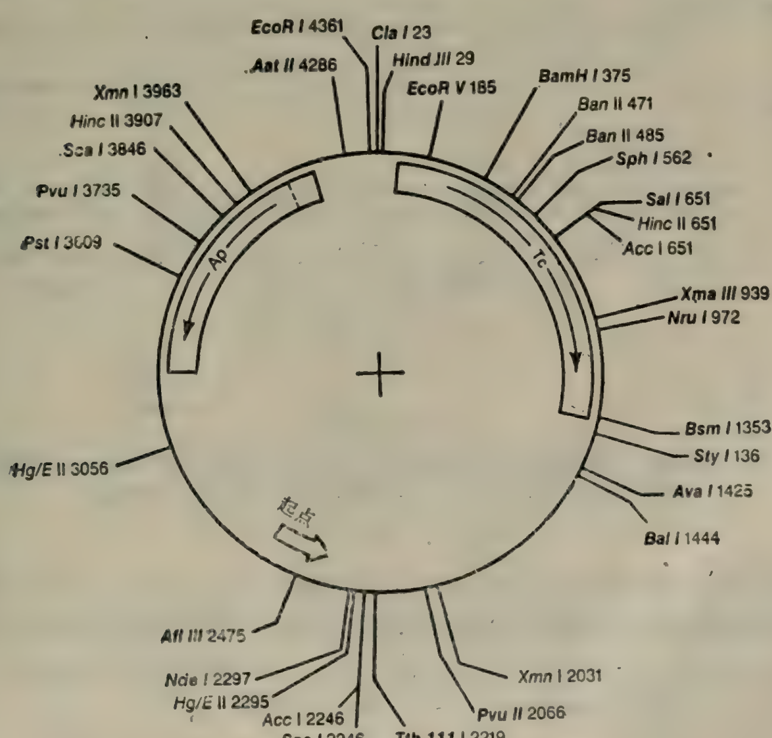


图 4.1　pBR322 的限制性图谱，黑体的限制性内切酶只有一个切点。

DNA 插入到 pBR322 的 *Pst*I 位点，则当成功地将此质粒转化到大肠杆菌中去后，它虽不能提供对氨苄青霉素的抗性，但仍能提供对四环素的抗性。

参考文献

Bolivar, F., Rodriguez, R., Greene, P., Betlach, M., Heynecker, H., and Boyer, H., *Gene* 2:95, 1977.
Sutcliffe, J., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 75: 3737, 1978.

4-2 M13

M13 是细丝状、雄性特异的大肠杆菌噬菌体，它含有 7.2kb 的单链环状 DNA 基因组。

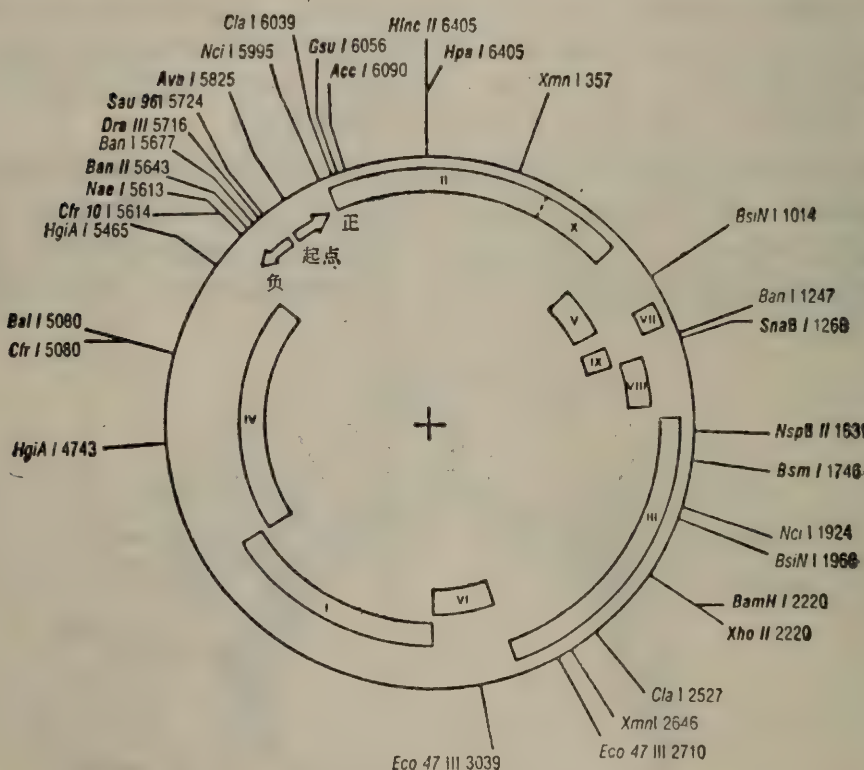


图 4.2 野生型 M13 的限制性酶切图谱和 mp7、mp8、mp9、mp10、mp11、mp18、mp19 结构的多功能克隆繁殖位点。此 mp 系列载体由改良的野生型 M13 组建。

M13mp 系列的克隆繁殖载体是野生型 M13 噬菌体的改良品种，许多 DNA 片段易于克隆繁殖进入此噬菌体载体。已将一个多聚衔接顺序(或一组限制性位点)引入 Lac Z 基因的氨基末端。Lac Z 基因是编码代谢半乳糖的酶(β-半乳糖苷酶)的结构基因。用未携有插入片段的 M13mp 噬菌体感染某些缺乏 β-半乳糖苷酶 (gal^-) 的细菌，如 JM103 或 JM109，补充宿主细胞的 gal^- 表型，使这些细菌成为 gal^+，并使这些细菌能够将半乳糖类似物 Xgal 代谢成为一种蓝色素。一种定位在多聚衔接区的克隆插入片段将阻断 lac Z

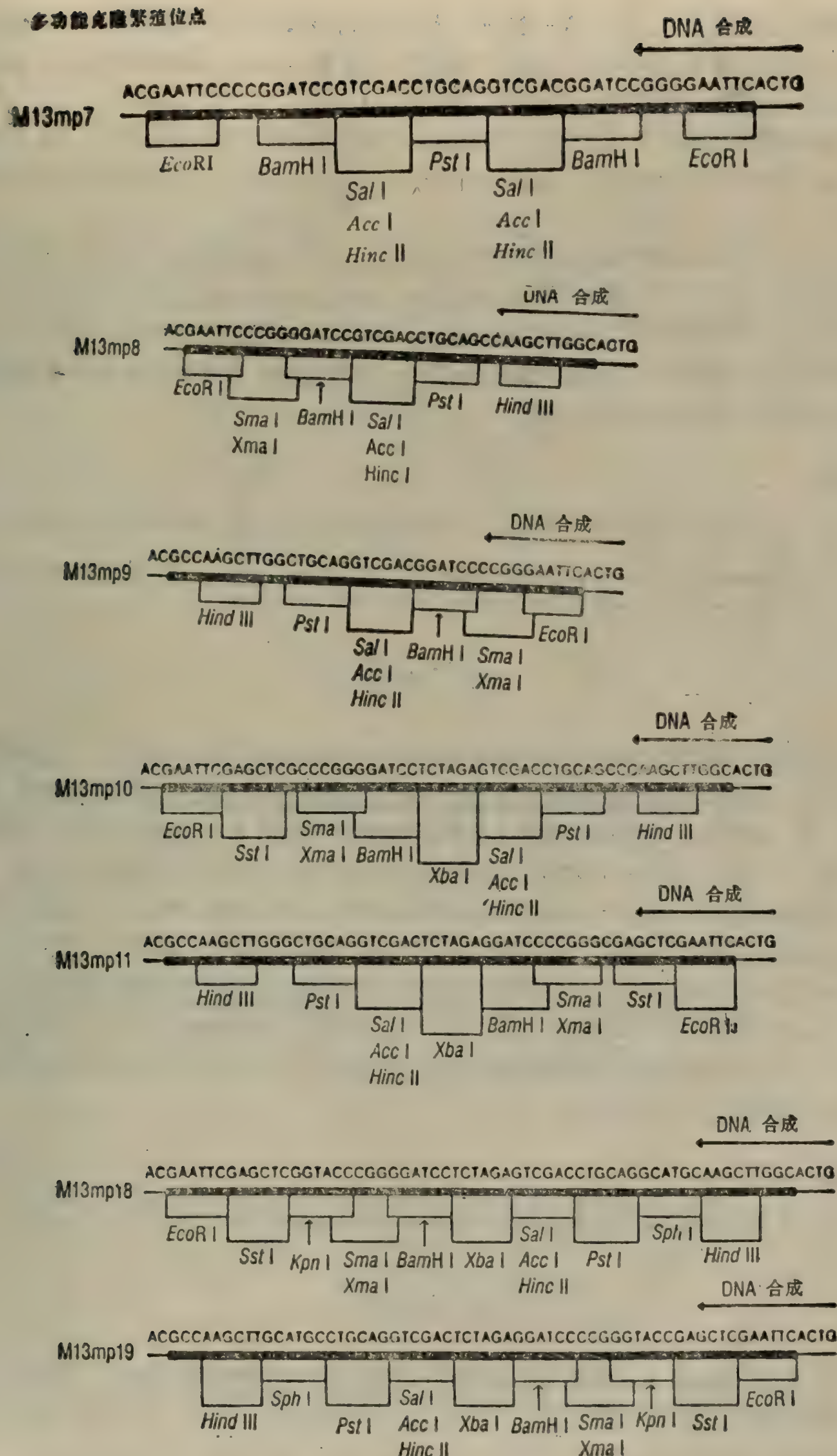

多功能克隆繁殖位点
DNA 合成
ACGAATTCCCCGGATCCGTCGACCTGCAGGTCGACGGATCCGGGGAATTCACTG
M13mp7
EcoRI
BamH I
Sal I
Acc I
Hinc II
Pst I
Sal I
Acc I
Hinc II
BamH I
EcoR I
DNA 合成
ACGAATTCCCGGGGATCCGTCGACCTGCAGCCAAGCTTGGCACTG
M13mp8
EcoR I
Sma I
Xma I
BamH I
Sal I
Acc I
Hinc I
Pst I
Hind III
DNA 合成
ACGCCAAGCTTGGCTGCAGGTCGACGGATCCCCGGGAATTCACTG
M13mp9
Hind III
Pst I
Sal I
Acc I
Hinc II
BamH I
Sma I
Xma I
EcoR I
DNA 合成
ACGAATTCGAGCTCGCCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGCCCAAGCTTGGCACTG
M13mp10
EcoR I
Sst I
Sma I
Xma I
BamH I
Xba I
Sal I
Acc I
Hinc II
Pst I
Hind III
DNA 合成
ACGCCAAGCTTGGGCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCGGGCGAGCTCGAATTCACTG
M13mp11
Hind III
Pst I
Sal I
Acc I
Hinc II
Xba I
BamH I
Sma I
Xma I
Sst I
EcoR I
DNA 合成
ACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCACTG
M13mp18
EcoR I
Sst I
Kpn I
Sma I
Xma I
BamH I
Xba I
Sal I
Acc I
Hinc II
Pst I
Sph I
Hind III
DNA 合成
ACGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCACTG
M13mp19
Hind III
Sph I
Pst I
Sal I
Acc I
Hinc II
Xba I
BamH I
Sma I
Xma I
Kpn I
Sst I
EcoR I

图 4.2

基因，使噬菌体变为 gal^-。因此有一些 lac^- 大肠杆菌，例如 JM103 或 JM109，即使被重组 M13mp 噬菌体感染，亦不能将 Xgal 代谢成为蓝色素。所以，透明的空斑表示含插入片段的噬菌体，而蓝色的空斑则含有野生型非重组体。

单链寡核苷酸引物可由多个商业来源得到，因此利用双脱氧链终止方法能直接测定 M13mp 插入片段的核苷酸顺序。此外，引物延长可以产生用于 S1 核酸酶分析的放射性单链探针。

从 M13mp 8 和 mp 9 开始，可得到成对的载体，它们在克隆繁殖区的核酸内切酶位点次序正好相反。这对于一个具有不对称末端的插入片段，从两端进行顺序分析是非常有用的。最近，mp 系列又增加了两种新型载体和mp18和 mp19。它们在多聚衔接区含有几个新的限制性位点，使得在克隆繁殖时能更为灵活。这些噬菌体在采用双脱氧链终止法（第16 章）进行顺序分析时是非常有用的。

参考文献

Messing, J., Gronenborn, B., Muller-Hill, B.,and Hofschneider, P. H., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **74**: 3642, 1977.

Messing, J. In: Methods in Enzymology 101 (part C): Recombinant DNA. (R. Wu, L. Grossman, and K. Maldave, eds.). Academic Press, New York, 1983, pp. 20—78.

4-3 pUC

此系列质粒具有许多对分子生物学家有利的 pBR 和 M13 质粒的特点。这些小质粒（2.7kb）具有 pBR322 氨苄青霉素抗性基因、pBR322 的复制起点和大肠杆菌 Lac Z 基因的部分。唯一的限制性内切酶识别位点的多聚衔接顺序是在 Lac 区内，这与 M13 的多克隆繁殖位点一样。此 pUC 质粒能生长出很高的复本数，并且可以用氯霉素扩增。当 DNA 片段克隆进 pUC 的这个区域，则使 Lac 基因失活。这些质粒当转化进入适当的 Lac^- 大肠杆菌，例如 JM103 或 JM109，并且在含 IPTG 和 Xgal 的条件下培养时，便产生出白色或透明的菌落。不含插入片段的 pUC 转化进入同样的细胞则产生蓝色的菌落。与 M13 系列一样，pUC 载体可成对地使用，在这一对 pUC 载体中的克隆繁殖区内，它们的 RE 位点相对于 Lac Z 启动子呈相反的次序，pUC8 和 9 以及pUC18 和 19 就是这样的两对载体。pUC 载体的使用在 15-4 中介绍。

参考文献

Vieira, J., and Messing, J., *Gene* **19**: 259, 1982.

4-4 λgt10

λgt10 是含 43kb 的由 λ 噬菌体衍生的线性双链 DNA 的克隆繁殖载体，它对于克隆繁殖像 cDNA 插入片段这样的小的（＜7kb）、在其末端连有 *Eco*RI 衔接物的 *Eco*RI 片段是很有用的。DNA 插入至 λgt10 唯一的 *Eco*RI 位点，使 cI（阻遏物）基因失活，产生 cI^- 噬菌体。未重组的 λgt10 是 cI^+，在像 c600 这样的合适的大肠杆菌宿主中形成混浊空

多功能克隆繁殖位点

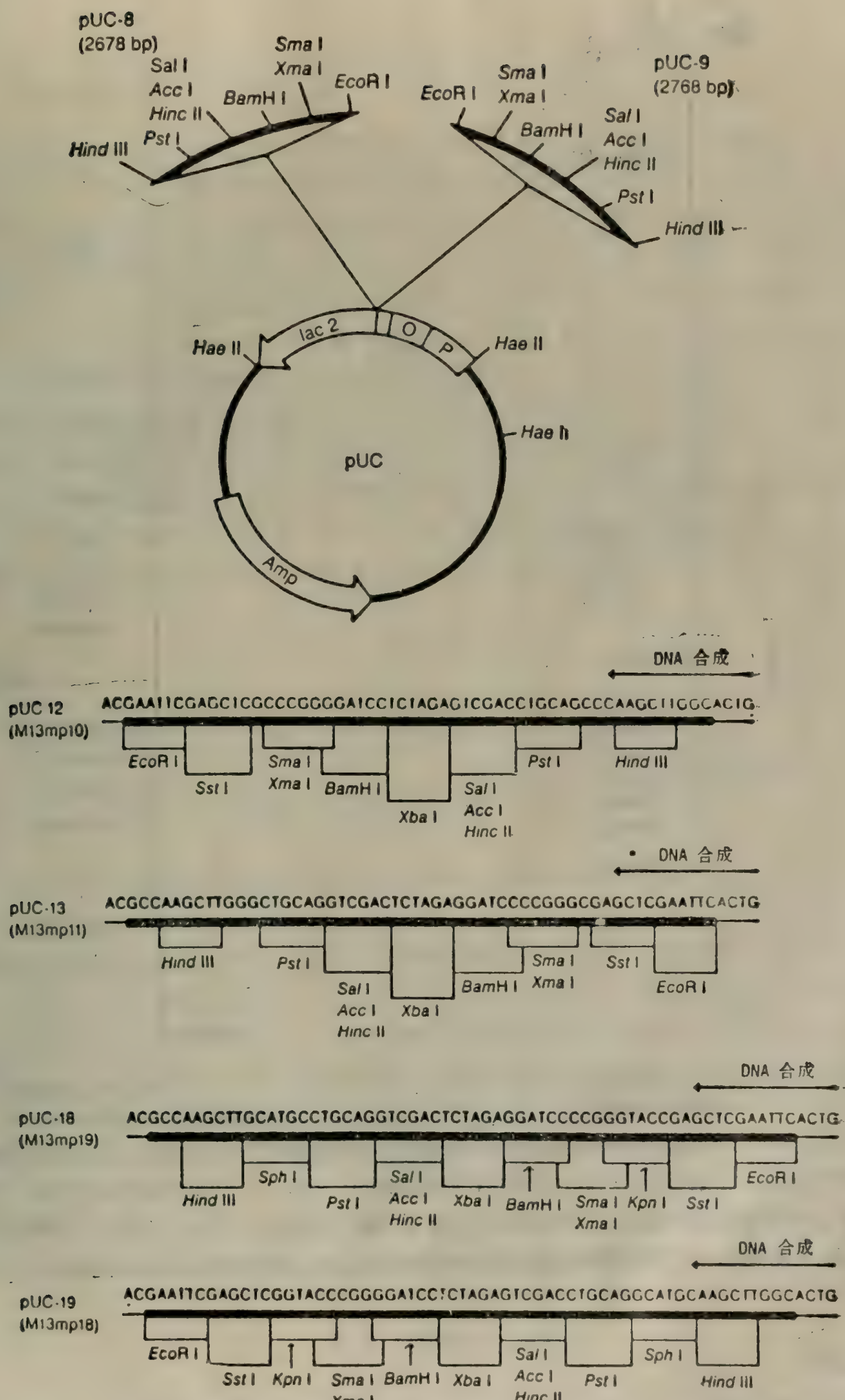


图 4.3 pUC 质粒，示出 pUC 8,9,12,13,18 和 19 的多聚衔接区的限制性酶切图谱。

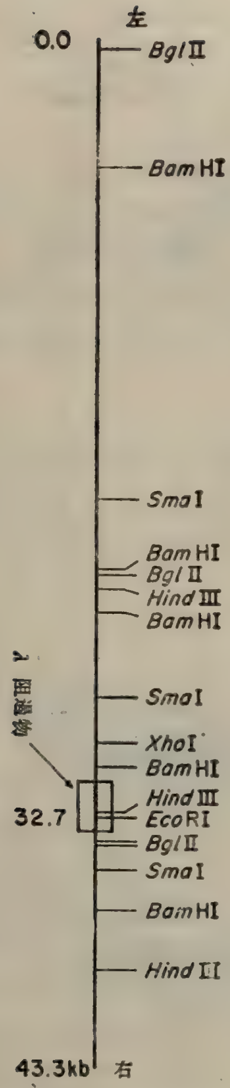


图 4.4 λgt10,示出多功能克隆繁殖区中的主要限制性内切酶位点。

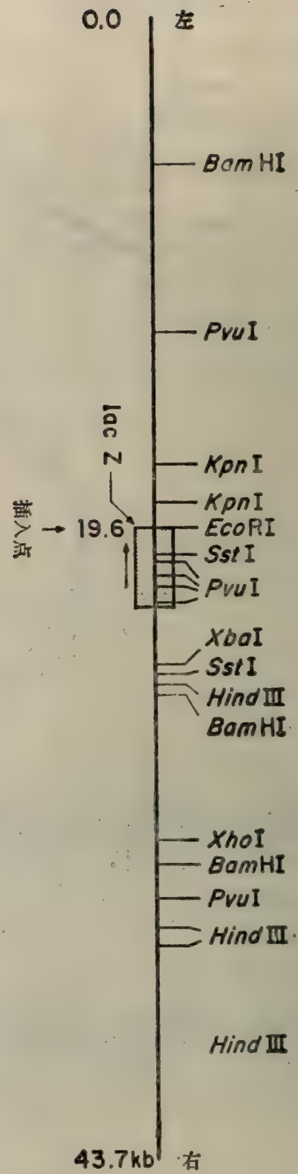


图 4.5 λgt11,示多功能克隆繁殖区的主要限制性内切酶位点。

斑,而重组的 cI^- 噬菌体则形成与混浊空斑易于分辨的透明空斑。此外,在一种携带 hflA 150 突变(高频率的溶原性突变)的大肠杆菌菌株中,只有 cI^- 噬菌体能形成空斑,而 cI^+ 的未重组的噬菌体能有效地形成稳定的溶菌元,看不见空斑,因此,当在 c600 HflA 中使用 λgt10 系统时,对是否携有重组体的噬菌体可因其空斑的形成而易于选择。

参考文献

Huynh, T., Young, R., and Davis, R., Constructing and screening cDNA libraries in λgt10 and

λgt11. In: DNA Cloning: A Practical Approach (D. Glover, ed.) IRL Press, Oxford, 1984.
Murray, N., Brammer, W., and Murray, K., *Mol. Gen. Genet.* 15:53, 1977.
Young, R., and Davis, R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 1194, 1983.

4-5 λgt 11

λgt11是含43.7kb的线性双链λ噬菌体克隆繁殖载体，专门用于克隆繁殖小的*Eco*R$_I$片段(<6kb)，特别是带有*Eco*RI衔接片段的cDNA片段。供插入外源性DNA所用的唯一*Eco*RI位点处于LacZ基因羧基端附近。在此克隆繁殖载体中，外源性DNA顺序可被表达为β-半乳糖苷酶融合蛋白。由λgt11产生的重组体基因文库可用抗体探针或用核酸探针筛选，因为抗体能检测由重组体λgt11噬菌体表达的融合蛋白。另外，外源性DNA插入*Eoc*RI位点使噬菌体成为gal^-，而未重组的λgt11是gal^+。对合适的gal^-的大肠杆菌宿主(Y1090)，重组噬菌体在Xgal板上形成透明空斑，而未重组噬菌体则形成蓝色空斑，使插入片段的存在与否很容易被判别。与λgt10相反，对未重组的噬菌体无选择。因此，用核酸探针筛选时，λgt10是较好的载体，用抗体探针时，则采用λgt11。

此种克隆繁殖载体还有两种有用的遗传性质：(1)含有一个对温度敏感的溶菌生长(cl857)的阻遏物，它在42℃失活，在32℃活化，具有对溶原生长的选择作用；(2)它有一个琥珀突变S100，能使所有不含强琥珀校正突变的大肠杆菌宿主表现出溶菌作用缺陷。

参考文献

Young, R., and Davis, R., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 80: 1194, 1983.

4-6 EMBL3 和 EMBL4

EMBL3是λ替换载体，携带两组促进*Mbo*I、*Bam*HI、*Eco*RI、*Bgl*II、*Xho*I、*Bcl*I和*Sal*I切割片段克隆繁殖的多聚衔接顺序。在经部分*Mbo*I消化后，它作为一个能产生基因组文库的克隆繁殖载体是非常有用的。此克隆繁殖载体可以容纳多至约23kb的插入片段，使其适合于基因组文库的构建。多聚衔接顺序的设计简化了对15—20kb大小的*Mbo*I片段的克隆繁殖载体的制备。并且，此多聚衔接顺序能在克隆繁殖位点使被克隆的DNA易于移去。这种双链的44kb DNA噬菌体在像LE392这样的合适的大肠杆菌宿主菌株中生长良好。这是一种对构建基因组文库很有用的载体。还有一种载体——EMBL4，它在多聚衔接区用于克隆繁殖*Eco*RI片段的内切酶位点次序正好颠倒。

参考文献

Frischauf, A.-M., Lehrach, H., Poustka, and Murray, N., *J. Mol. Biol.*, 170: 827, 1983.

4-7 Charon 28

Charon 28是最初用于克隆大的*Bam* HI和*Mbo* I片段的λ替换载体之一。此克

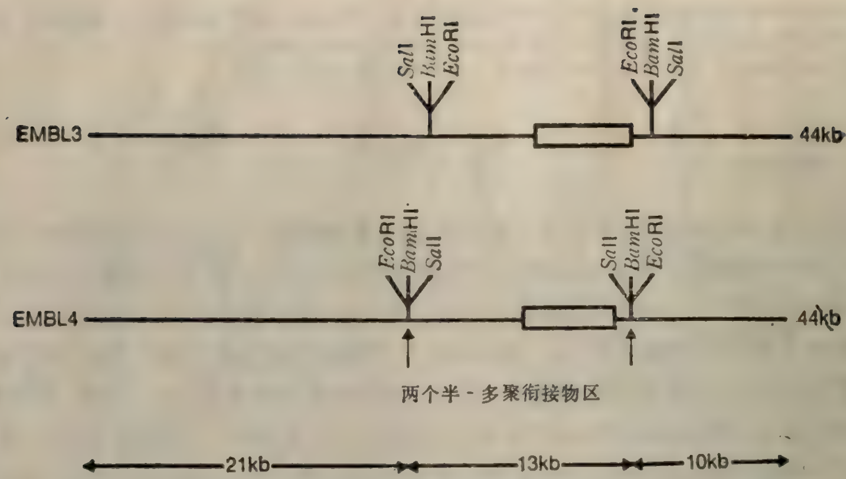


图4.6　EMBL3 和 EMBL4，示出用于克隆繁殖的限制性内切酶位点的方向。

隆繁殖载体可以容纳多至 20kb 的插入片段。目前存在的许多真核细胞基因组文库都是用此载体构造的。其插入位点缺少 EMBL3 中具有的多聚衔接区，使得切断被克隆的插入片段或制备克隆繁殖载体颇为困难。此外，在 Charon 28 构建的文库中，各种重组体的

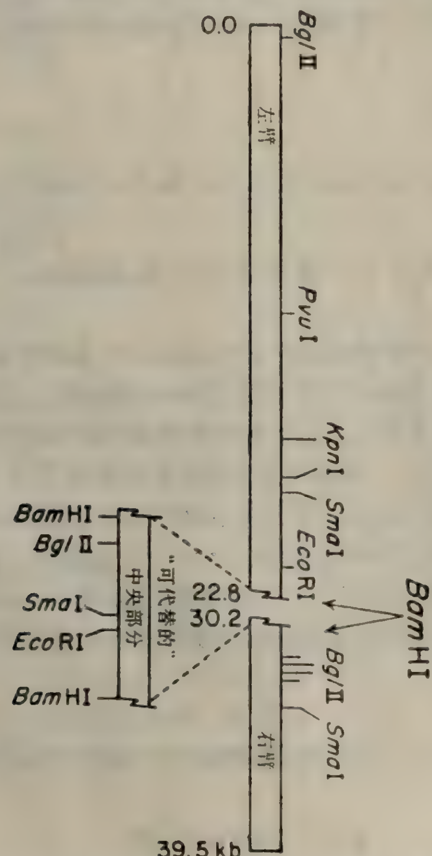


图4.7　在 Charon 28 2221 载体上有具代表性的限制性内切酶位点。Charon 是一个替换载体，图中裂隙表示中心部分被去除，以接受一段 5—20kb 的 DNA。

噬菌斑大小波动很大，这对筛选文库是不利的。

参考文献

Blattner, F., *et al.*, *Science*, **196**: 161, 1977.

Rimm, D. L. Horness, D., Kucera, J., and Blattner, F. R., *Gene* **12**: 301, 1980.

4-8 细菌菌株

大部分宿主细菌菌株是由大肠杆菌衍生的。由于它们独特的遗传性质，不同的克隆繁殖载体需要特异的宿主细胞以供转染。下表列出了本书中介绍的载体及其所用的宿主细胞。

载　体	宿主细胞*	培养基	章　节
pBR322	LE392, HB101, JM107, JM109	LB(含抗生素)	15-2
pUC 系列	JM103	LB（含氨苄青霉素）	15-4
λ噬菌体	LE392	LB 含 $MgSO_4$	12-1
M13	JM103, JM107, JM109	LB	16-5
EMBL3	LE392	LB 含 $MgSO_4$	13-5
Charon28	LE392, c600	LB 含 $MgSO_4$	13-5
λgt10	c600, c600hflA	LB 含 $MgSO_4$	14-1
λgt11	Y1090, BNN97	LB（含氨苄青霉素和 $MgSO_4$）	14-1
pSP64, pSP65	LE392,HB101	LB（含氨苄青霉素）	11-7
Bluescribe	JM109	LB（含氨苄青霉素）	11-7

* JM103、JM107、和 JM109 的细胞贮存在小型的琼脂板上。

不同的供应商对每一载体系统还提供了另外的细菌宿主。细菌菌种可由 American Type Culture Colletion（ATCC）或其它的细胞贮存单位购得(见附录 III)。

（刘亚霞译　姚志建校）

第 5 章　真核细胞 DNA 的制备

5-1 DNA 的快速制备法

提要

本节介绍用最少的步骤和时间制备多份小样品的方法，所制备 DNA 的质量可适用于限制性片段的 Southern 印迹分析。但由于组织匀浆器切断了基因组 DNA，使经此法纯化的 DNA 质量还不能适用于 DNA 文库。

实验所需时间

4—5 小时

特殊设备

组织匀浆器(Polytron 或其它同类装置)
振摇器

试剂

匀浆缓冲液 4ml
　0.1mol/L NaCl
　0.2mol/L 蔗糖
　0.01mol/L EDTA
　0.3mol/L Tris, pH8.0
10% SDS
SS-苯酚
氯仿
8mol/L 醋酸钾溶液
乙醇
TE 缓冲液

方法

1. 将 DNA 组织块(例如 100mg 以下的小鼠尾巴)放入 10ml 带盖的聚丙烯管［注释(i)］。
2. 加入 2.0ml 匀浆缓冲液。
3. 用组织匀浆器(如 Polytron)研磨至无小块可见。
4. 加 125μl 10%SDS，旋涡振荡混匀。
5. 在 65℃ 水浴至少保温 30 分钟。

6. 加 350μl 8mol/L 醋酸钾，旋涡振荡混匀，冰浴样品 60 分钟。

7. 离心 5 000×g，10 分钟，4℃。

8. 将上清液移入另一支 10ml 试管，弃沉淀。

9. 加 2ml 氯仿和 2ml SS-苯酚于提取液中，旋涡振荡或颠倒试管以混匀。将其静置或稍一离心至两相分离。

10. 将上面水层移入另一支试管，弃下层液体。

11. 加 2ml 氯仿，同上法混匀。静置至分出两相。吸出下层氯仿并弃之。

12. 将 5ml 乙醇加入水层以沉淀DNA。颠倒试管轻轻混匀。离心 1 500×g，10分钟。DNA将形成小沉淀块。

13. 去除上清液，加 5ml 80% 乙醇，轻轻混匀。

14. 离心 1 500×g，5 分钟。

15. 去除乙醇，吸干液体。将试管在室温静置至少 30 分钟，使沉淀物部分干燥，但不得完全干燥。

16. 将沉迹物重新悬浮在 300 μl TE 缓冲液中，在室温轻轻振摇 90 分钟，4℃ 保存。DNA 样品是稳定的，可保存 6 个月以上。

17. 样品现可供 RE 裂解(5-4)，并可加到琼脂糖凝胶中进行电泳(5-5)[注释(2)]。

注释

(1) 好的组织来源是距小鼠尾部末端 2cm 处。当进一步工作前需要在活鼠上做基因组DNA 分析时，这是特别有用的。DNA 来源也可以是果蝇、培养细胞和小块新鲜或冰冻的组织。含高水平内源性 DNA 酶的组织可能产生降解的 DNA 样品。

(2) 由于样品中 RNA 的污染，这种方法制备的 DNA 样品不能被精确地测定光吸收。

5-2 制备真核细胞 DNA 的一般方法

提要

此方法适用于 Southern 印迹和文库构建的高质量、高分子量的基因组 DNA 的制备。用蛋白酶 K 从细胞中释放核酸，然后用 RNase A 去除 RNA。此方法主要用于培养的细胞。

实验所需时间

第 1 天：1 小时

第 2 天：5 小时

第 3 天：6 小时

试剂

磷酸盐缓冲生理盐水 (PBS)

蛋白酶 K 溶液，1mg/ml(BM)溶于：

10mmol/L Tris, pH7.4

10mmol/L EDTA

150mmol/L NaCl

0.4%SDS（最后加）

SS-苯酚

氯仿

TE 缓冲液

RNase A(不含 DNA 酶)，10mg/ml [注释(1)]

3mol/L 醋酸钠，pH7.4

乙醇

方法

实验准备

培养细胞供提取 DNA。各种类型的培养细胞都适用。

提取 DNA

1. 将 10^9 细胞置于 15ml 带盖试管离心 1 000×g,5 分钟[注释(2)]。倾去培养液。
2. 将沉淀物重新悬于 10ml PBS 中,重复步骤 1。
3. 将 1 体积的压积细胞与 10 倍体积的蛋白酶 K 溶液混合。
4. 65℃ 保温 15 分钟。
5. 置于 50ml 带螺帽的聚丙烯试管中，37℃ 轻轻振摇过夜。

次日——清洗 DNA

6. 用等体积的 1:1 的 SS-苯酚、氯仿混合液抽提溶液，倒转试管以充分混匀，移入 30ml Corex 管中。离心 12 000×g,10 分钟,分相。
7. 用底端口大的吸管将上层水相移入另一支试管。小心地保留界面。
8. 重复有机溶剂抽提步骤 6 和 7,直至两相间的界面物质看不见为止。
9. 将水相移入另一 30ml 试管。
10. 测量水相体积，加 1/10 体积的 3mol/L 醋酸钠及 2.5 体积的乙醇，颠倒试管混匀。
11. 基因组 DNA 应立即沉淀。
12. 离心 12 000×g,10 分钟,收集沉淀的 DNA,将其用 5ml 80% 乙醇洗涤,离心收集 DNA。倾去乙醇并空气干燥 DNA 片刻。
13. 将 DNA 沉淀物重新溶解于 4.5ml TE 缓冲液中。如果 DNA 难于再溶解,可将沉淀物在 37℃ 振摇过夜,令其溶解。

第三日

14. 加 25μl 10mg/ml RNase A（不含 DNA 酶),37℃,30 分钟。
15. 加 500μl 3mol/L 醋酸钠和 5ml 1:1 的 SS-苯酚、氯仿混合液，颠倒试管多次以混匀样品。

16. 离心 12 000×g，10 分钟，分离两相。

17. 将上层水相移入另一试管，加 5ml 氯仿，重复步骤 16。

18. 将上层水相移入另一 30ml Corex 管中[注释(3)]。加 12.5ml 乙醇(2.5 倍体积)。当溶液通过颠倒试管混匀后，基因组 DNA 应即刻沉淀。

19. 离心，方法同步骤 16，倾出上清。

20. 加 5ml 80% 乙醇洗沉淀，离心同步骤 16。

21. 倾出乙醇，将沉淀物置空气中干燥，但勿使其完全干燥。

22. 将 DNA 沉淀再次悬浮于 TE 缓冲液中。 大量的 DNA 可能需要在 37℃ 过夜才能完全溶解[注释(4)]。

23. 在 260nm 读O. D.，测定其浓度(20-3)。

24. DNA 现可用于限制性内切酶消化和做其它鉴定 [注释(5)]。

注释

(1) 不含 DNA 酶的 RNase A 的制法：将 RNA 酶以 10mg/ml 悬浮在 TE 缓冲液中，70℃ 加热 10 分钟，使 DNA 酶失活，然后慢慢冷却。

(2) 所有试管必须非常干净。使用之前，用 50% 硝酸洗涤 30ml 的厚壁玻璃试管(如 Corex)，以去除管内 DNA。用前彻底冲洗高压消毒。

(3) 见注释(2)。

(4) 经乙醇沉淀后，基因组 DNA 难以再溶于水溶液中，重新溶解可能需要在 37℃ 保温振摇过夜。在此步骤最好不要浓缩 DNA (即保持 DNA＜1mg/ml)，以便使 DNA 充分溶解。

(5) 如果用限制性内切酶不能很好地切割 DNA，则此制品经再用蛋白酶 K 消化、有机溶剂抽提和乙醇沉淀处理，可能会有用。

5-3 从培养细胞和组织中制备 DNA

提要

本方法用于从组织或培养细胞中制备非常纯的基因组 DNA，也可产生极高分子量的 DNA，并涉及核的初制品。本方法是三种方法中最复杂和最费时的。

实验所需时间

第 1 天：6—7 小时

第 2 天：1—2 小时

试剂

5% 柠檬酸

0.88mol/L 蔗糖溶于 5% 柠檬酸中

1 × *RSB* 缓冲液

10mmol/L Tris，pH7.4

10mmol/L NaCl

25mmol/L EDTA

10% *SDS*

粉末状(BM)蛋白酶K

二乙醚

SS-苯酚

氯仿

异戊醇

乙醇

5mol/L*NaCl*

RNase A (BM) 10mg/ml 贮存液,在 70℃ 加热 10 分钟去除 DNA 酶。

TE 缓冲液

3mol/L 醋酸钠, pH7.4

Tris/盐缓冲液

10mmol/L Tris, pH7.4

25mmol/L EDTA

0.5mol/L NaCl

0.1 × SSC 缓冲液

方法

实验准备

准备待分离 DNA 的新鲜组织[注释(1)]。必要时应吸去血块并剪去结缔组织。在这项制备中至多用 5g 组织。其余组织在开始步骤 1 以前冻存在 −70℃。

组织的准备 [注释(2)]

1. 用杵将研钵中被液氮部分浸泡的约 5g 组织捣成粉末(戴上保暖手套并注意保护眼睛)。当组织被研成粉末后即倾入 50ml 的带盖试管中。让液氮蒸发,加 10ml 1 × RSB 缓冲液,进行步骤 2。也可用下面的方法:

将 5g 新鲜的剪碎组织放在含 30ml5% 柠檬酸的Dounce匀浆器中,用插入较松的研杵将其匀浆,直到杵能移动自如。然后用紧套的杵再次研磨至上下移动自如(8—10 次)。通过 10 层消毒纱布(预先用 5% 柠檬酸浸湿)过滤,离心 2 500×g,5 分钟。将沉淀物用玻璃吸管轻轻搅起,悬浮在 10ml 5% 柠檬酸中。将 15ml 0.88mol/L 蔗糖(30%)的 5% 柠檬酸溶液放在一支用酸洗过的 30ml Corex 管中,再把上述重新悬浮的匀浆置于上层。在吊篮式转头上 5 000×g 离心 5 分钟(如HB4 转头离心 3 500rpm[1])。吸去上层,重新将细胞核沉淀物悬浮于 10ml 1 × RSB 缓冲液中。离心 2 500×g,2 分钟。重复用 1×RSB缓冲液洗沉淀物,直至悬浮液 pH 为 7.4 (吸一小滴于 pH 试纸上测试)。

2. 将 SDS 加入粉碎的组织混合物或细胞核悬液中,直至浓度达 1% (一般加入 1ml 10%SDS),因为 DNA 从细胞核里释放出来,样品将变得粘滞。

1) rpm 为非许用单位,1rpm = 1r/min。

3. 加入 11mg 蛋白酶K粉末(浓度 1mg/ml)。37℃保温 1—2 小时。再加 11mg 蛋白酶K,继续保温至少 1—2 小时或更长一些,直至组织完全溶解。

4. 加 1ml 5mol/L NaCl。

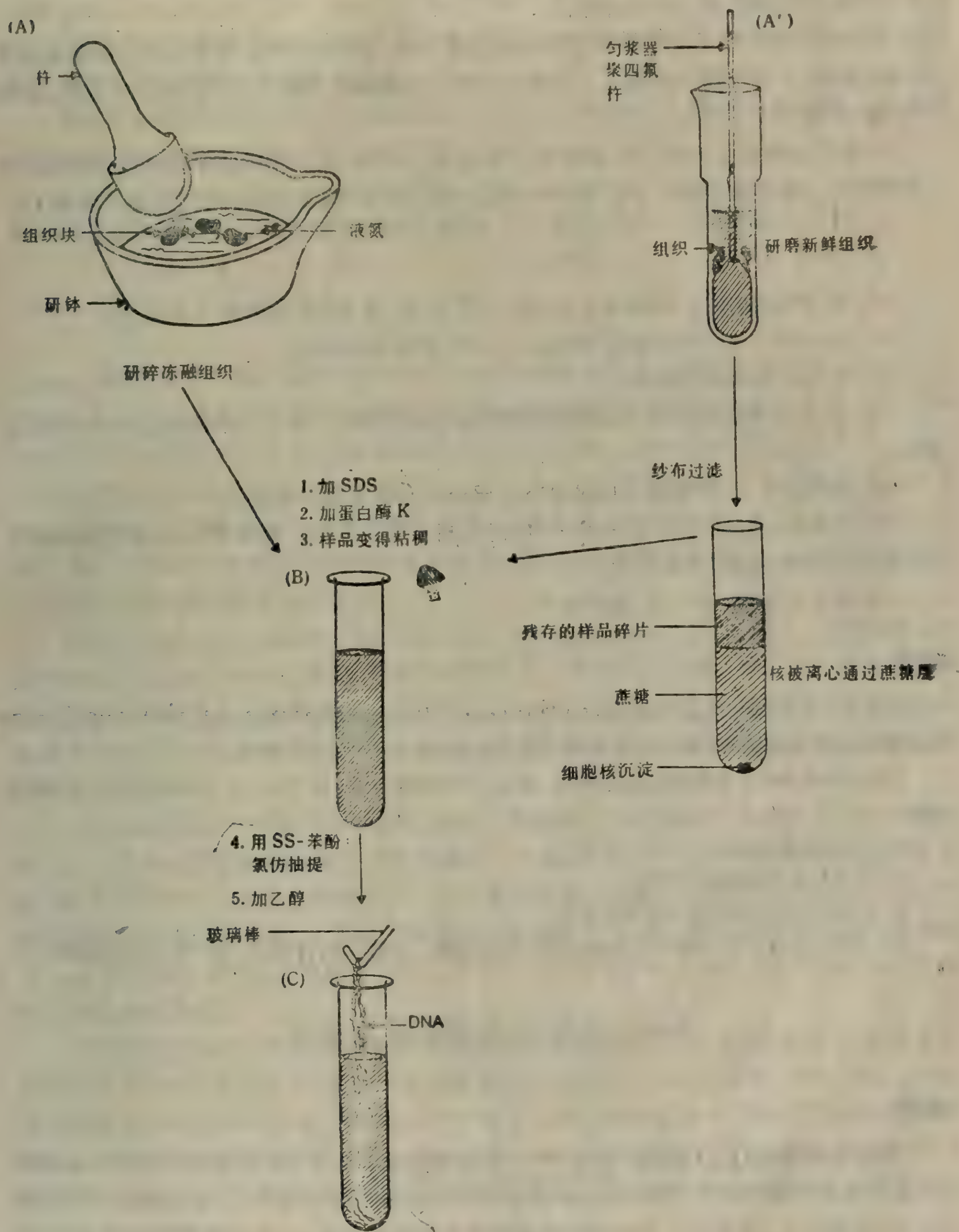


图5.1 DNA 的制备。冻融组织并将其研碎(A)或用蔗糖密度离心分离细胞核(A')。从蛋白质和细胞碎片中分离、抽提和沉淀 DNA。大分子量的部分可用玻璃棒去除。

5. 用等体积的 SS-苯酚:氯仿:异戊醇(10:10:1)混合液抽提，轻而彻底地颠倒试管混匀，短暂离心分相。用底端大口的吸管将上层水相移入另一试管。

6. 用 2 倍体积的二乙醚[注释(3)]抽提水相。

7. 吸去上层醚，保留下层水相。

8. 加 2.5 倍体积无水乙醇沉淀 DNA [注释(4)]，大片的 DNA 可用一根玻璃棒缠绕其纤维而收集，并转入另一新管中。过量的乙醇用无菌棉花签吸去。如需要去除 RNA，继续按步骤 10 操作。

9. 将沉淀物溶于 5.0mlTE 缓冲液，4℃ 过夜。DNA 在 4℃TE缓冲液中是非常稳定的[注释(5)]。除非需要进一步去除DNA制品中的 RNA [注释(6)]，否则可进入步骤 16。

去除残存 RNA

10. 将 DNA 溶解在 10ml 0.1 × SSC，4℃ 过夜，使 DNA 得到进一步纯化。

11. 加 20μl 不含 DNA 酶的 RNaseA，37℃ 保温 30 分钟。

12. 加 1ml 5mol/L NaCl。

13. 加 10ml SS-苯酚和 10ml 氯仿。倒转试管轻轻混匀，离心 12 000×g，10分钟，分出两相。

14. 两相分开后，用底端大口吸管将上层含水层移入另一试管。

15. 加 25ml 乙醇(预先冷却到 −20℃)，同步骤 8 一样，移除 DNA。将沉淀物溶于 TE 缓冲液，4℃ 过夜[注释(6)]。

16. 样品贮存在 4℃ TE 缓冲液中。

注释

(1) 我们感兴趣的大部分组织都可按此方法进行。比较各种组织可能显示出 DNA 的重排，特别是在某些组织(如肿瘤或 B 细胞)中。大体上说，5g 组织将产生 1—5mg DNA。

(2) 冰冻研磨对大多数组织是较好的，也是一种简便的方法，但 Dounce 匀浆可能更适用于培养细胞。

(3) 在通风橱内操作。

(4) DNA 是白色纤维状物质。

(5) 长期贮存时，加 1 滴氯仿到样品中。

(6) DNA 溶液可能太粘稠了，以致于不能完全溶解。如果这样，再多用一些 TE 缓冲液稀释。

5-4 限制性内切酶及其应用

提要

限制性内切酶(RE)是切断双链 DNA 的细菌性酶。I 型 RE 对细菌的功能起重要作用，但并不能切断特定顺序的 DNA。本书介绍并应用的为 II 型 RE，它作用在高度特异的DNA裂解位点，因此在分子生物学领域是非常有用的工具。这类酶能使确定的 DNA 片段被克隆繁殖和纯化。迄今已知的约 500 种 RE 一般均由各种细菌菌株中分离出来。

RE 存在于细菌体内可能是通过在特定识别位点裂解外源 DNA 从而破坏它们(如感

染的噬菌体)。而宿主细菌的 DNA 受到保护免于断裂是因为特异的识别位点经过修饰,通常是位点的碱基之一甲基化,使此位点不再是 RE 裂解的底物。实际上,已由各种细菌菌株中提纯了具有不同识别位点特异性的 RE, 并由分子生物学家用来在特定条件下将真核细胞来源的纯化的 DNA 在体外反应中裂解成特定的片段。在实验室用于增殖克隆DNA 的宿主细菌通常是宿主限制性基因的突变种(hsdR、hsdM 或 hsdS),因此,它们的细胞外酶活性不会破坏外源重组体顺序。

许多 RE 裂解位点的专一性已经确定。例如: 限制性内切酶 *Eco* RI 要求 6 个碱基对以下面的特定次序出现: 5′…GAATTC…3′

3′…CTTAAG…5′

Eco RI 识别此顺序并以特定的方式将其裂解,产生带有凸出 5′ 末端的两个末端:

…G　　　　AATTC…

和

…CTTAA　　　　G…

这些末端是互补的("粘性的")可被 T4 DNA连接酶酶促反应重新连接至其它 *Eco* RI产生的末端上。另外的RE 识别另外的顺序,利用独特的裂解产生其它的确定的末端,其中某些也含有 5′ 凸出的末端、3′ 凸出的末端,或者没有凸出的 (平滑的)末端(见表 5.1)。每种 RE 均识别由特定核苷酸顺序和数目所产生的位点。某些 RE 不需要在识别位点的每一位置均有特异的核苷酸。例如,有时在特定位置,只要是任一种嘌呤核苷酸(A 或 G)即足已。因此 RE 切断 DNA 的频率与识别顺序中碱基的数目(如需要较多碱基, 则倾向于较少的切口)及任一位置的特定碱基有关。

RE 的用途在于: 它的专一性, 它产生的可连接的末端能以可控制的、可预知的、位点特异的方式进行 DNA 的分割、分析和重新建造。因为它们是酶, 所以每种酶对产生最适裂解活性的条件均有特殊要求。庆幸的是,许多酶在相同条件下均有活性,主要的改变是离子强度 (即缓冲液中的 NaCl)。 采用每种 RE 作为研究工具的实际条件已凭经验确定下来。

RE 活性的量通常不是采用经典的酶动力学来确定,而是根据实验室实际用的术语来确定。一个单位(U)的RE活性往往是指这样一个量:即在 37℃、1 小时,能将 1μg DNA 样品(通常是噬菌体 λ)的所有特异位点切下所需的酶量。如果存在其它的 RE 消化位点,实际表现的酶活性可能不同。 例如: 在标准测定条件下 1U 的 RE 足已在一个位点完全切开 1μg 噬菌体 λ DNA,却可能不足已切下有 4 个 RE 位点的 1 μg DNA样品或是一种没有完全纯化的样品。

有关反应条件的其它因素也影响 RE 活性。这些包括 DNA 纯度、缓冲液、温度条件和 RE 本身。DNA 的甲基化、结合了蛋白质或在粘性溶液中高分子量的 DNA 的过分粘性也可能减少 RE 的水解效率。待切的 DNA 通常应该没有杂质,SS-苯酚/氯仿抽提和乙醇沉淀(20-1) 将去掉许多干扰杂质。另一方面,大部分 RE 通常并不受 RNA 或单链DNA 的影响。因此, 加入 t RNA 作为共沉淀物是有用的, 因为它不影响后期 RE 水解又有利于小量 DNA 的回收。

典型的测定 RE 反应的条件包括缓冲液 (常用 10mmol/L Tris, pH7.4)、10mmol/L Mg^{2+} 及微量的螯合剂 (TE 缓冲液含极低量的 EDTA)。 RE 缓冲液也应 有适当的盐浓

表5.1 限制性内切酶

RE 名称	所用缓冲液	特异的水解位点	RE 名称	所用缓冲液	特异的水解位点
AvaI	L	5′ C|YCGR G 3′ 3′ G RGCY|C 5′	*MspI*	L	C|CG G G GC|C
AvaII	L	G|GAC C C CTG|G	*PstI*	H或L	C TGCA|G G|ACGT C
BalI	O	TGG|CCA ACC|GGT	*PvuI*	H	CG AT|CG GC|TA GC
BamHI	H	G|GATC C C CTAG|G	*PvuII*	L	CAG|CTG GTC|GAC
BglII	H	A|GATC T T CTAG|A	*SacI(SstI)*	O	G AGCT|C C|TCGA G
ClaI	L	AT|CG AT TA GC|TA	*SacII*	L	CC GC|GG GG|CG CC
EcoRI	H	G|AATT C C TTAA|G	*SalI*	H	G|TCGA C C AGCT|G
HaeIII	L	GG|CC CC|GG	*Sau3A*	L	|GATC CTAG|
HincII	L	GTY|RAC CAR|YTG	*SmaI*	K	CCC|GGG GGG|CCC
HindIII	L	A|AGCT T T TCGA|A	*StuI*	H	AGG|CCT TCC|GGA
HinfI	H	G|ANT C C TNA|G	*TaqI*	L	T|CGA A GC|T
HpaI	L或K	GTT|AAC CAA|TTG	*XbaI*	H	T|CTAG A A GATC|T
HpaII	O	C|CG G G GC|C	*XhoI*	H	C|TCGA G G AGCT|C
KpnI	O	G GTAC|C C|CATG G	*XmaI*	O	C|CCGG G G GGCC|C
MboI	H或L	|GATC CTAG|			

注：A——腺嘌呤；C——胞嘧啶；G——鸟嘌呤；N——碱基；T——胸腺嘧啶；R——嘌呤；Y——嘧啶。缓冲液：O——无盐；L——低盐；H——高盐；K——钾盐。

度，为每一种 RE 提供最佳的离子强度。有时还加入 BSA、DTT 和亚精胺来实现最佳酶活性。4 种通用的 RE 缓冲液可以满足大多数 RE 的需要，后面将介绍这些缓冲液的 10 倍贮存液的事先配制。大部分 RE 水解在 37℃ 完成，但也有少数例外，如 *Taq* I。

大多数出售的 RE 是用适当的贮存缓冲液装运，并且含有 25—50% 甘油，防止在 −20℃贮存时结冻。5%(v/v)以上的甘油浓度在 RE 水解测定时可以抑制许多 RE 的活性。另外，高浓度的甘油在 RE 水解时可以减弱某些 RE 的顺序专一性，导致错误的水解。例如，这种现象见于通常所用的限制性内切酶 *Eco* RI，在某些条件下观察到的这种假活性称为 *Eco* RI*(星号)活性。为此原因，使 RE 水解反应的体积增加足够大，至少对 RE 本身做 1:10 稀释(因此而降低甘油浓度)是很重要的。其它因素：如 pH、乙醇或不适当的盐浓度也可引起星号活性或活性降低，故而小心遵循所要求的条件很重要。

使用 RE时，尚应注意到：转移 RE 时，每次用新的吸管尖。微量的污染物进入 RE 贮存液，便影响其进一步使用，使以后的试验出现混乱的结果。最适化反应时，宁愿多加一些 RE，而不要使保温时间大大超过 1 小时。而且，如上所述，规定酶活性仅根据切割 DNA 标准而言。因为你的样品一般说来与此标准品差异较大，所以一个好方法是对切断每微克 DNA 用大约 2—3U 的 RE，特别是在试图水解一个困难样品时。有时滴定一下水解 DNA 样品所需的 RE 量可能是必要的。

最后，如果采用两种RE，必须注意分别提供其各自的最适盐浓度。如果两者要求同一缓冲液，则可同时水解，也可先后进行。如果需要不同的盐浓度，那么用低盐浓度的 RE 必须首先使用，保温之后，调节盐浓度，再用需要高盐浓度的 RE 水解。在任何时候，用 SS-苯酚/氯仿抽提均可去除 RE 活性。某些 RE 是不耐热的，可经加热至 70℃、5 分钟而失活。然而，这种性质在 RE 之间各不相同，对所用的每种 RE 应当要分别核实。

实验所需时间

2 小时

试剂

所用缓冲液取决于每种RE的最适测定条件。酶的供应厂家推荐最佳缓冲液并提供有关内切酶活性的资料。归纳制造商的文献，将常用 RE 和缓冲液列于表 5.1 中。

标准贮存缓冲液

10×缓冲液 O——无盐

100mmol/L Tris, pH7.4
100mmol/L $MgCl_2$
1mg/ml BSA
10mmol/L DTT

10×缓冲液 L——低盐，含 0.5mol/L NaCl，余同缓冲液 O。

10×缓冲液 H——高盐，含 1.0mol/L NaCl，余同缓冲液 O。

10×缓冲液 K——钾盐缓冲液，含 100mmol/L Tris, pH8.0 和 200mmol/L KCl，余同缓冲液 O。

方法

实验准备

根据用何种 RE 及实验目的来决定实验条件。表 5.1 列出了某些典型 RE 的水解位点和供参考的缓冲液条件。值得注意的是全部限制性内切酶均水解双链 DNA，并对所指出的位点是高度特异的。由厂商提供的商业来源的质粒和噬菌体载体的限制性图谱将有助于选择合适的 RE。

分析性水解

1. 进行小量 RE 反应，将下列试剂放入一支 1.5ml 微型离心管，37℃ 保温 1 小时。

    1μl 适量的 10×缓冲液

    1μl DNA 样品(0.1—5μg)

    1μl RE(含 0.2—10U)

    用蒸馏水补至 10μl。

2. 保温后，水解的 DNA 与标准品及一份原始未经酶切的 DNA 一起进行微型胶电泳(9-1)。这能检测 RE 裂解 DNA 是否完全［注释(1)］。如果小规模反应的结果良好，则 RE 反应可放大进行(如：250—400μl 体积)，以制备 DNA 用于在制备性琼脂糖电泳或聚丙烯酰胺凝胶电泳后电洗脱，从而得到进一步纯化(9-3)。
3. 人们可能想推算用于大规模制备的 RE 浓度来测定 RE 的用量：

    1U 的 RE 37℃ 作用 1 小时以上能切 1μg DNA，实际上应当使用相当于保证完成水解所需量的 2—3 倍那么多的单位[注释(2)]。

4. 在微型凝胶上分离的 DNA 片段可用电洗脱回收，供进一步使用(9-3)。
5. 除了做凝胶电泳外，样品可用 SS-苯酚/氯仿抽提和乙醇沉淀方法纯化(20-1)。

注释

(1) 1份 RE 水解的 DNA 在微型凝胶电泳前经与 DNA 连接酶保温，便可重新连成片段。如果 RE 水解产生的末端是完整的，那么这个操作将产生高分子量连接的 DNA。

(2) 样品中过量的 RE 可能对结果有副作用；污染的内切酶可以在其它位点切开 DNA，或者污染的核酸外切酶可以破坏限制性片段的末端。不同厂家或批号的酶的活力和效率各不相同，可参考厂家的文献所提供的进一步信息。

5-5 琼脂糖凝胶电泳

提要

琼脂糖凝胶电泳是根据 DNA 片段的分子量而将其划分。较小的片段迁移比较大的片段快；在凝胶中 DNA 片段迁移距离与分子量的对数成反比。因此通过已知大小的标准品移动的距离，并与未知片段的泳动距离进行比较，便可测定出片段的大小。这项技术可分离复杂 DNA (即基因组 DNA)，用于 Southern 印迹分析，或分离较简单的噬菌体和质粒克隆的水解产物用于 RE 位点分析和印迹。

实验所需时间

第 1 天：1—1.5 小时

第 2 天：2—5 小时

特殊设备

用于 20 × 20cm 凝胶的水平凝胶(潜水型)电泳仪(有许多型号可采用,包括 BRL 型 H4)

电源

微波炉

可穿透紫外线的塑料凝胶成型器

紫外线透照仪

试剂

琼脂糖(Biorad 超级纯或 Seakem)

1 × TAE 缓冲液

溴乙锭,10mg/ml

凝胶加样缓冲液

方法

实验准备

制备用于分析的 DNA,包括RE水解物。

制胶

1. 将 2.4g 琼脂糖加至 300ml 1 × TAE 缓冲液中,配成 0.8% 琼脂糖[注释(1)]。琼脂糖在微波炉或沸水浴中加热溶化。灌胶前将琼脂糖冷却至 60℃。

2. 推荐使用商品化的塑料凝胶成型器制胶。如采用 20 × 20cm玻璃板,将胶布沿此干净的玻璃板绕一周形成一圈"墙"。在拐角处用指甲油封住胶布,包装用的或高压灭菌的胶布都可采用[注释(2)]。用巴斯德吸管在胶布周边铺一圈 60℃ 的琼脂糖,用做封固。这大约需要 12.5ml 琼脂糖溶液。

3. 加 30μl 溴乙锭至剩余的琼脂糖[注释(3)]搅动混匀,但避免出气泡。

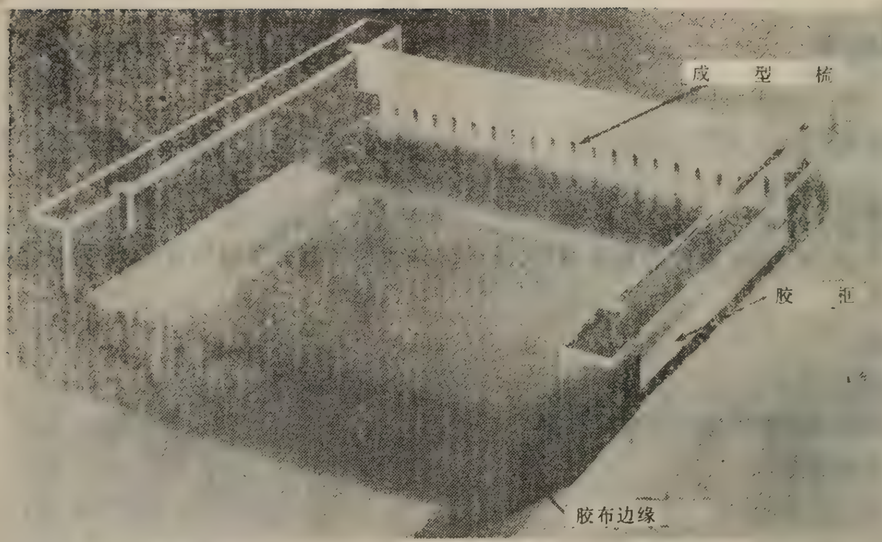
4. 将剩余的琼脂糖溶液倾入胶布密封的玻璃板或凝胶成型器,制备凝胶。

5. 在凝胶一侧放置样品槽成型梳,将梳子夹在胶上方的桥上,并保证梳齿在玻璃板的稍上一点,但不要接触玻璃板。

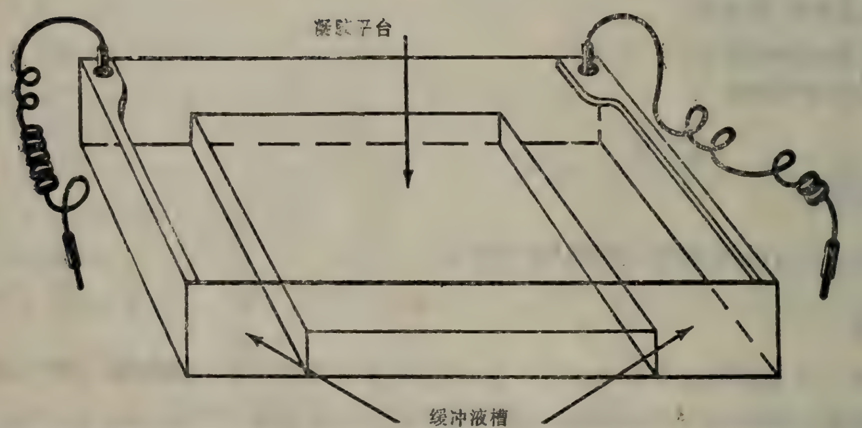
6. 待胶变硬,直到它呈乳白状且不透明(约 20 分钟)。配制 2L 1 × TAE 缓冲液,用于电泳槽。将缓冲液倒入洁净的凝胶槽,轻轻去除梳子和胶布。

7. 将凝胶玻璃板水平放置在电泳槽中。

8. 用吸管去除加样槽内气泡,凝胶应完全浸入缓冲液,但覆盖的缓冲液不要超过 1cm。



A



B

图5.2 A. 琼脂糖凝胶的照片，可见胶布封的边缘和在位的样品槽成型梳；
B. 凝胶电泳仪的示意图。

9. 向每25μl样品中加5μl凝胶加样缓冲液，小心将样品加入每一样品槽内[注释(4)]。

10. 接通电源，电压 35—40V，电泳过夜。DNA 从负极移至正极。另一种方法是，如果不是分离基因组 DNA，凝胶电泳可采用较高电压(一般可高到 100V)，使电泳时间缩短。

次日

11. 次日上午，将电压开至 50V，至染料前缘向下移动到大约 80%处（约 4 小时以上）[注释(5)]，关闭电源。

12. 用紫外透照仪(20-4)对凝胶中溴乙锭着染的区带拍照。凝胶现已可用于 Southern 印迹或组分制备。

注释

(1) 0.8% 琼脂糖凝胶适用于 1—25kb 大小的 DNA 片段。对较小的 DNA (200—2 000bp)，采用 1.5% 琼脂糖；对较大的片段(20—100kb)，用 0.5% 琼脂糖。

(2) 能买到在两面壁上可定位安放样品槽成型梳的凝胶成型器，这是目前普遍使用的。

(3) 溴乙锭是一种致癌物，操作应仔细，戴手套。

(4) 样品一般是由 RE 水解 DNA 后获得的(5-4)。大约 10—15μg 的基因组 DNA，或每条区带 20μg 克隆 DNA 便可容易地用溴乙锭染色检测出来。如果 DNA 加样太多(如每条区带超过 1μg)，则区带被破坏。DNA 浓度可通过 O. D. 测量(20-3)而确定。加样应仔细，保证在吸管尖没有气泡，不要用力排空全部体积(即最后部分液滴)，以防止任何气泡搅乱加样槽里的样品。λ DNA 的 *Hind* III 水解物作为分子量标准对大小标定是有用的(见 9-2，步骤 3)。

(5) 如果有必要，凝胶电泳也可继续在 35—40V 泳动 8 小时。

5-6 Southern 印迹

提要 NC

Southern 印迹是一项将 DNA 从琼脂糖凝胶上直接转移到放置在凝胶面上的硝酸纤维(NC)膜上的技术。DNA 被变性、中和并通过毛细作用在高盐缓冲液中转移。这种变性的、与滤膜结合的单链 DNA，在滤膜烤干后可永久地结合在滤膜上，再将其与放射性标记的探针杂交，即可检测杂交的 DNA。

实验所需时间

第 1 天：3 小时
第 2 天：3 小时

试剂

A 液：配制 1L

5mol/L	*NaCl*	300ml
10mol/L	*NaOH*	50ml
蒸馏水		650ml

B 液：配制 2L

10mol/L	醋酸铵[注释(1)]	200ml
10mol/L	*NaOH*	4ml
蒸馏水		1 796ml

NC滤膜[注释(2)]　20 × 20cm

方法

实验准备

在琼脂糖凝胶上电泳分离 DNA (5-5)。为溴乙锭染色的凝胶照相(20-4)。

第一天

1. 将每块琼脂糖凝胶(标准规格 20 × 20cm)放入盛有 500ml A 液的塑料盒中，室温放置。用手不时地摇动。30 分钟后，换 500ml 新鲜的 A 液。继续不时地振摇 30 分钟。这一步骤是使双链 DNA 变性。

2. 用 500ml B 液替换 A 液，使胶的 pH 转为接近中性。同上法不时振摇 30 分钟。换 500ml 新的 B 液，再不时振摇 30 分钟。

3. 在另一塑料盘中放 500ml 新鲜 B 液。用溶液 B 将 Whatman 3MM 滤纸浸湿，起

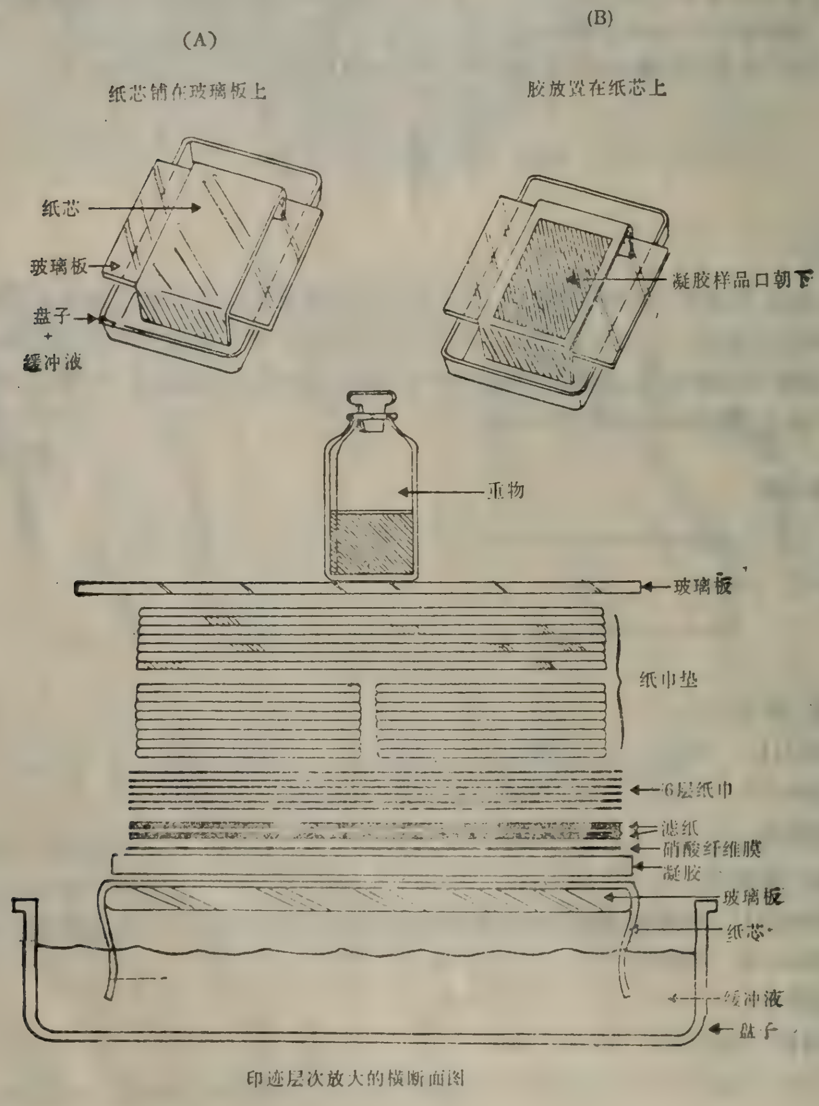


图 5.3 Southern 或 Northern 印迹的制备。(A) 纸芯铺在玻璃板上的位置;(B)凝胶放置在纸芯上;(C)最后放置各种材料的示意图。

纸芯作用。我们使用从 23cm 宽的滚筒上撕下的 50—60cm 的长条滤纸。放置一块 20 × 30cm 的塑料或玻璃板架在盘子的顶端，将纸芯放置在这块板上，两端下垂入溶液中。 在玻板顶部用 5ml 玻璃吸管滚动铺平纸芯，从而去除干扰转印[见图5.3(A)]的隐蔽的气泡。

4. 小心地从步骤 2 含 B 液的盘子里提起凝胶，方法是将一块玻璃板垫在其下面运送。用第二块玻璃板覆盖凝胶。将胶拿至纸芯上方，将胶翻转，去除上层玻璃板，把胶滑至纸芯上，将胶与纸芯和玻璃板的边缘对齐。 铺平胶并用玻璃吸管在其表面滚动去除隐藏的气泡[见图 5.3(B)]。注意：胶目前是面朝下，因为从底部印染有利于高分辨效果和维持样品在 NC 膜上从左至右的方向。

5. 将 20 × 20cm NC 滤膜预先在水中浸湿[注释(3)]。直接将滤膜放在凝胶上，同上法铺平[注释(4)]。

6. 将 20×20cm Whatman 3MM滤纸在水中或 B 液中预先浸湿[注释(5)]，放置在NC滤膜上，同上法铺平。用第二张 3MM 滤纸覆盖，同上法铺平。

7. 用 6 层干而平整的纸巾一层层铺在 3MM 滤纸上，它们在开始时起毛细作用，将液体吸至整个滤纸。

8. 另外放置 4 叠 3cm 厚的折叠纸巾在顶部(每边放置两叠)。

9. 顶部再放一块玻璃板，玻璃板上放一不太重的重物[约 250g，见图 5-3(C)]。DNA 转印至 NC 膜约需 4 小时或过夜。

第二天

10. 拿去重物、顶部玻璃和纸巾。去掉伸出的纸芯末端[注释(6)]。 沿着玻璃板底部较易撕去纸芯末端。

11. 翻转滤纸、NC、凝胶组成的“夹心面包”。去除此刻已在上层的纸芯。在所有加样槽中心向下扎一针孔穿过 NC 膜，标记加样的位置。 在第一个加样槽上方扎另一针孔为以后定向及鉴定用。注意此时从左至右的方向是与加样时的顺序相同的。

12. 取下胶并弃之。将滤膜晾干几分钟，用圆珠笔在 NC 上部仔细标上凝胶号。 在实验记录本上依次将所有凝胶编号，并注意记录样品数目、日期、条件、样品名称等等均是有用的。将 NC 滤膜放在两层 20 × 20cm Whatman 3MM 滤纸之间，用小块胶布在两边加固。

13. 放置在真空烘箱中 80℃ 2 小时，将 DNA 固定在滤膜上。

14. 在室温小心存放(在 3MM 滤纸之间)，直到用于杂交。

注释

(1) 由于醋酸盐在真空箱内有较高的挥发性，较易去除，因此，现用于缓冲液中代替 NaCl.

(2) Gene Screen Plus (NEN) 或尼龙可用来代替 NC，因为它们在重复使用方面比后者更耐用。使用时须参照厂家的说明对方法做相应的修改。

(3) 为了实验的一致性，减少操作和浪费，购买统一的 20 × 20cm 规格的凝胶框架、滤纸和 NC 滤膜是有益的。

(4) 所有铺平操作都是用一支 5ml 玻璃管在表面轻轻滚动完成的。

(5) 我们采用打开的 Scott 175 (棕褐色)单折纸巾，因为它们有较强的吸水性，而且便宜和容易操

作。

(6)第二天的所有操作都须戴手套。

参考文献

Smith, G., and Summers, M., Anal. *Biochem*. 109: 123, 1980.
Southern, E., *J. Mol. Biol*. 98: 503, 1975.

(刘亚霞译　姚志建校)

第 6 章　用标记的合成探针探测核酸

6-1　合成 DNA 探针的制备：总论

提要

人工寡核苷酸 DNA 探针，一般长度为 20—50bp，在探查和鉴定 DNA 或 RNA 样品方面有许多用途。下面两种类型的探针可被合成：

1. 如果感兴趣的 DNA 或 RNA 的顺序已经知道，可以合成完全互补的探针。

2. 如果探针顺序的决定是由一种蛋白质产物的氨基酸顺序推论而来，则由于遗传密码的简并性，不可能合成出一种单一的、与为那种蛋白质编码的 RNA 互补的、一定长度的探针。然而，当了解了遗传密码和密码子的使用频率，人们可根据使用频率提出一种有依据的猜想，或设计出包括所有可能性编码的一组探针。随着自动化合成仪器的进展，制造人工探针变得比较容易，使此方法更加普及。因此，现在几乎所有的探针都是由仪器合成的，它们的化学合成也就不再在此介绍。而且许多商业机构目前都提供为顾客合成探针的服务。

探针的选择

一般来说，探针越长，杂交能力越强且更特异。然而，自动化合成仪常常以大约 50bp 为最适探针长度(即：长度愈长，产量愈少)。如果已知 RNA 或 DNA 的顺序，可选出独特的区段并用计算机做对照比较(有这样的信息服务机构)，来确定该顺序中独特的区域(最好是 20bp 以上)和该区域的互补碱基顺序（例如：G 配 C 或 A 配 T)。书写的顺序通常是 5′→3′（从左至右)，被选出的顺序是 3′→5′（从左至右)，但是可以方便地以颠倒的顺序重写一遍(即 5′→3′)。例如：

感兴趣的顺序	5′GCCTAAC 3′
探针的互补顺序	3′CGGATTG 5′
颠倒的互补顺序	5′GTTAGGC 3′

如果 RNA 或 DNA 顺序是未知的，而氨基酸顺序已被测定，就可根据密码子的简并性(见下表)制备一套人工探针。很可能这套探针中的某一顺序是正确的，特别是在探测 cDNA 或 RNA 顺序的时候。如果正在检测的是基因组 DNA，一个内含子区有可能阻断此顺序，那么这套探针系列中就可能没有一个是正确的顺序。通常，在一组探针中，最多可用同时制造的 16 或 32 种探针。因此，如果有 128 种可能性，则要合成 4 套32种顺序的探针。

例如，对 His-Val-Met 这样的氨基酸顺序，其选择的探针可能由下列 8 种不同的 RNA 顺序中的一种来编码：

表6.1 遗传密码

第二核苷酸

第一核苷酸	U		C		A		G	
U	UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys
	UUC	Phe	UCC	Ser	UAC	Tyr	UGC	Cys
	UUA	Leu	UCA	Ser	UAA	Term.	UGA	Term.
	UUG	Leu	UCG	Ser	UAG	Term.	UGG	Trp
C	CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg
	CUC	Leu	CCC	Pro	CAC	His	CGC	Arg
	CUA	Leu	CCA	Pro	CAA	Gln	CGA	Arg
	CUG	Leu	CCG	Pro	CAG	Gln	CGG	Arg
A	AUU	Ile	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser
	AUC	Ile	ACC	Thr	AAC	Asn	AGC	Ser
	AUA	Ile	ACA	Thr	AAA	Lys	AGA	Arg
	AUG	Met	ACG	Thr	AAG	Lys	AGG	Arg
G	GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly
	GUC	Val	GCC	Ala	GAC	Asp	GGC	Gly
	GUA	Val	GCA	Ala	GAA	Glu	GGA	Gly
	GUG	Val	GCG	Ala	GAG	Glu	GGG	Gly

注：

氨基酸	符号	氨基酸	符号
丙氨酸	Ala	异亮氨酸	Ile
精氨酸	Arg	亮氨酸	Leu
天冬酰胺	Asn	赖氨酸	Lys
天冬氨酸	Asp	甲硫氨酸	Met
天冬酰胺或天冬氨酸	Asx	苯丙氨酸	Phe
半胱氨酸	Cys	脯氨酸	Pro
谷氨酰胺	Gln	丝氨酸	Ser
谷氨酸	Glu	苏氨酸	Thr
谷氨酰胺或谷氨酸	Glx	色氨酸	Trp
甘氨酸	Gly	酪氨酸	Tyr
组氨酸	His	缬氨酸	Val

从5′→3′阅读的 RNA 三联密码子编码的氨基酸被列于表内，下面划线的密码子 UAA、UAG 和 UGA 是终止顺序，黑体印刷的密码子 AUG 是起始顺序。

His　Val　Met

1. 5′ C A C G U U A U G 3′
2. C A C G U C A U G
3. C A C G U G A U G
4. C A C G U A A U G
5. C A U G U U A U G
6. C A U G U C A U G
7. C A U G U G A U G
8. C A U G U A A U G

为了鉴定此顺序，必须合成8种不同的互补顺序：

1. 5′ C A T A A C G T G 3′
2. C A T G A C G T G
3. C A T C A C G T G
4. C A T T A C G T G
5. C A T A A C A T G
6. C A T G A C A T G
7. C A T C A C A T G
8. C A T T A C A T G

无简并性的含 Met 或 Trp 的顺序为首选，而有 Leu、Ser、和 Arg(每个氨基酸有 6 种可能性)的顺序应避免。

合成一组探针的另一策略是选择一条单个的、较长的(25—40bp)寡核苷酸顺序、此寡核苷酸顺序代表了对正确顺序的最合理的猜测。猜测的依据是来自密码子使用频率的统计学分析。即使仍会有某些误配，探针的长度还是会增加密码子的稳定性。

最近，报告了一种采用脱氧肌苷残基代替 NTP 合成寡核苷酸探针的新途径 (Ohtsuka 等，1985)。所得探针中的脱氧肌苷残基与感兴趣的 DNA 形成较误配碱基稳定的杂交，减小了制造全套探针的需要。

参考文献

Lathe, R., *J. Mol. Biol.* **183**: 1, 1985.
Ohtsuka, E., Matsuka, S., Ikehara, M., Yoosuke, T., and Matsubara, K., *J. Biol. Chem.* **260**: 2605, 1985.

6-2 合成探针的末端标记

提要

T4 多聚核苷酸激酶能特异性地将 γ-^{32}P 标记物从 ATP 转移至 DNA 或 RNA 的 5′羟基。此反应可用于 DNA 和 RNA 分子的末端标记，如寡核苷酸、限制性片段和 mRNA。被标记的分子必须有一个 5′ 羟基。合成探针均典型地具有一个 5′ 羟基。DNA 限制性片段和 RNA 可能有 5′ 磷酸末端，在开始标记前需要用磷酸酶脱磷酸。

第二种用末端转脱氧核苷酰酶标记 3′ 末端的方法也一并介绍。

实验所需时间

2 小时

特殊设备

液体闪烁计数仪

试剂

柱洗脱缓冲液

TE 缓冲液 98ml

5 mol/L *NaCl*　　1ml

10% SDS　　1ml

共配制 100ml

G-50 Sephadex(P-L)柱

10×激酶缓冲液

500mmol/L Tris, pH7.4

100mmol/L $MgCl_2$

50mmol/L DTT

10mmol/L 亚精胺(必要时用)

T4 多聚核苷酸激酶,用甘油配成 10U/μl,贮存在−20℃(BRL 或 P-L)

γ-^{32}P-ATP (3 000Ci/mmol; 10μCi/μl;NEN)

10% *SDS*

方法

实验准备

准备 G-50 Sephadex。将其在水中浸泡过夜，温和地使胶粒膨胀，高压灭菌 [注释(1)]。或者可用 Nensorb 柱，以备将探针与未掺入的 ^{32}P-ATP (见 10-3)分离开。

激酶与标记探针的反应

1. 沿着 1.5ml 微型离心管的内壁，逐滴加入（即一滴滴液体彼此不相碰）下列试剂 [注释(2),(3)]:

寡核苷酸或 DNA 片段 (0.5μg)	1μl
10×激酶缓冲液	2.5μl
T4 多聚核苷酸激酶	1.5μl

2. 在 Plexiglas 挡板后,将 20μl γ-^{32}P-ATP(200μCi)加入试管,离心15秒钟,使液滴旋至微型离心管底部而混合。

3. 37℃ 保温 45 分钟。此时,将准备好的 Sephadex 倒入 5ml 柱至装满。用数个体积的柱洗脱缓冲液洗柱,并过柱直到柱顶部留下 100μl 液体,停止柱内液体流动。

4. 将样品管放入 65℃ 水浴 5 分钟,使酶灭活。

5. 再次将试管离心 5 秒钟。此刻样品可用于上 Sephadex 柱(见下文)以根据分子大小将未掺入的 ^{32}P-ATP 从样品中去除,或用 Nensorb 法(见10-3)将两者分开。

6. 加入 50μl 柱洗脱缓冲液至样品中,将样品加在 G-50 Sephadex 柱上,开始让柱流动。连续向柱内加 3 次 100μl 柱洗脱缓冲液。

7. 加 10ml 柱洗脱缓冲液于柱内。用 15 只微型离心管收集洗脱液，第一管装满，而剩下的 14 只管每只收集 0.5ml(约 12 滴),收集完后停止柱流动 [注释(4)]。

8. 每管取5μl至5ml闪烁液中，用液闪仪计数。合并第一个峰中计数高的各管 [注释(5)]。计算收集样品中每分钟每微升的计数，探针此刻即可用于杂交。在用于 Southern 印迹、Northern 印迹或空斑揭提前,将探针冻存在 −20℃。

注释

(1) 对水和微型离心管高压灭菌。室温保存 Sephadex 填料，附有漏斗、活塞和垫圈的 Kontes 420160 柱很好用。

(2) 小心处理放射性试剂和废物。戴手套并使用适当的屏蔽物。妥善处理含放射性试剂的缓冲液、试管和柱子。

(3) 另一方法是用末端转移脱氧核苷酰酶(TdT)标记探针的 3′末端。将 20μl ^{125}I、^{3}H、α-^{35}-S-dCTP 或 α-^{32}P-dCTP 盛在微型离心管中，在真空离心状态干燥。加 5μl 5×拖尾缓冲液（5mmol/L $CoCl_2$、1mol/L 二甲胂基钾，100mmol/L Tris-Cl、5mmol/L DTT，pH7.5）和 1μg 溶于 20μl 水中的合成的寡核苷酸探针。当加入 20U 的 TdT 后，37℃ 保温 45—120 分钟，随后的操作同步骤 3。当多种核苷酸被加至 3′末端时，可通过变性的丙烯酰胺凝胶(见 9-4)电泳检测它们的数目。

(4) 停止柱流动，并将其妥善地归入放射性废物中。

(5) 一般在洗脱的第一峰中，有 2—3 支管每管含有 10 000cpm/μl 以上，收集在一起。如果仅需要少量标记的探针，可仅用最高计数的一二管。

参考文献

Richardson, C. C.: In: Procedures in Nucleic Acid Research, Vol. 2(G. L. Cantoni and D. R. Davies, eds.) Harper & Row, New York, 1971, p. 815.

6-3 与 ^{32}P 末端标记合成探针的杂交

提要

本方法用标记的人工寡核苷酸探针杂交，以鉴定结合至滤纸上的同源 DNA 或 RNA。此法可用于圆形滤纸，以显示含互补核苷酸顺序的噬菌斑或菌落，或可用于由凝胶印迹的滤纸显示 DNA 或 RNA。最常用的滤膜是硝酸纤维膜(NC)或尼龙膜（例如：Gene Screen Plus)。合成探针与 DNA 或 RNA 之间的碱基配对受控于核酸的互补氢键(即 G 与 C，A 与 T 或 U)。在碱基对之间，氢键形成涉及缔合和解离的动力学，互补核酸长度增加则稳定性增加，有利于缔合。但是还有许多因素影响这一平衡。主要的是浓度、温度和杂交缓冲液中的盐浓度。因此，增加温度或降低盐浓度有利于双链的解离。影响双链杂交形式稳定性的还有两条顺序的错位(误配)，G-C 键与 A-T 键(G-C 键有 3 个氢键，与此相比，A-T 键有两个氢键)的百分比以及缓冲液中甲酰胺的量。已在模式系统(见参考文献)中研究了改变其中的每一因素所造成的结果，从而导出一则可用于估计解链温度(T_m)的一般公式(见步骤3)。此温度是指50％杂交的双链被解离的温度。因此，使用寡核苷酸探针鉴定同源互补顺序时需要知道这些由经验得出的有关因素。应用此公式可估计所应采用(即低于 T_m 约 15℃)的保温温度(T_i)和缓冲液中盐及甲酰胺浓度。不过这仅提供一个起点，对任何合成探针的最适信号与噪音之间比率的准确杂交温度通常还得凭经验来测定。在这些条件下，应对特定核苷酸顺序的测定有充分的敏感性，而且没有因对本底产生非特异性杂交而出现的干扰。

实验所需时间

第 1 天进行杂交：4 小时

第 2 天准备杂交的滤膜：3 小时

第 3 天检查放射自显影：1 小时

特殊设备

封袋装置

X 线片显影系统

试剂

杂交缓冲液-S

2 × SSC 缓冲液

方法

实验准备

用 T4 多聚核苷激酶和 γ-^{32}P-ATP 做末端标记，或用末端脱氧核苷转酰酶和 α-^{32}P-ATP，制备 ^{32}P 末端标记的合成 DNA 探针(6-2) [注释(1)]。准备用于杂交的 NC 滤膜 [注释(2)]。

预杂交

1. 将硝酸纤维膜放入加热可密封的塑料袋，向袋内加入 10ml 杂交缓冲液。折叠并夹住袋子一端密封，在室温将塑料袋放置 2—3 小时。

加入探针

2. 将约 2 × 10^{7}cpm 的探针加至另外的 10ml 缓冲液中，一同加入袋内。揉搓袋内缓冲液至混匀，密封塑料袋(见 20-2)。

3. 由下列公式或下表中测定保温时间(T_i)

a. $T_i = T_m - 15℃$

b. $T_m = 16.6 \log[\text{mol/L}] + 0.41[P_{gc}] + 81.5 - P_m - B/L - 0.65[P_f]$

其中：mol/L 是 Na^+ 的摩尔浓度，最大值为 0.5(1 × SSC 含 0.165mol/LNa^+)

P_{gc} 是指寡核苷酸探针中 G 或 C 碱基的百分比(在 30 和 70 之间)。

P_m 是误配碱基的百分比，如果已知的话(误配每百分之一将平均改变 T_m 1℃)。

P_f 是缓冲液中甲酰胺的百分比。

B 为 675 (对于合成至多为 100bp 的探针)。

L 是探针碱基长度。

因此，对于探针的 G/C 比为 50%，与感兴趣的顺序无误配、缓冲液中不含甲酰胺、并

碱 基	T_i (℃)		
	2 × SSC	1 × SSC	0.5 × SSC
50	65	60	55
40	62	57	52
30	56	51	46
20	45	40	35

含有指出的 SSC 浓度时,下表可用于预测 T_i,以作为实验的起点。

如果误配的数目未知，例如当使用从一个种系产生的探针去鉴定另一种系中的同源 DNA 或 RNA,则 T_i 起点应降低。如果探针长度超过 40bp，杂交缓冲液中可包含甲酰胺以降低所需的 T_i(每增加 1% 的甲酰胺,可降低约 0.65℃)。

4. 按步骤 3 所测定的保温温度,将塑料袋保温过夜。

次日

5. 从塑料袋中取出滤膜,小心保存袋内的放射性缓冲液,重新将塑料袋密封并弃之。

6. 在塑料皿中，用 250ml 预先调到保温温度的 2 × SSC 缓冲液冲洗滤膜约 5 分钟[注释(3)]。

7. 更换为低于保温温度 10℃ 的新缓冲液。在此新温度下保温 30 分钟，更换两次以上缓冲液,每次间隔 30 分钟,总共洗涤 4 次。

8. 在两张 Whatman 3MM 滤纸之间夹干滤膜,空气干燥 30 分钟。放置在 3MM 滤纸上,用透明的塑料纸覆盖。用放射性墨水在一张小的可粘附标签上标记,并贴在塑料纸上定向。

9. 用增感屏和 X 线片在 −70℃ 放射自显影过夜(见 20-5)。

第三日

10. 将 X 线片显影确定阳性的杂交。将包好的滤膜贮藏于安全处[注释(4),(5)]。

注释

(1) 小心处理放射性样品和废物。整个实验过程应戴手套。

(2) 滤膜可以是圆的(来自菌落揭提)或是长方形的（来自凝胶电泳)。 DNA 或 RNA 需经在真空箱干燥以与硝酸纤维滤膜结合。 几张方滤膜可放在同一袋内同时杂交；至多 20 张硝酸纤维膜或 6 张 Gene Screen 圆片可在同一袋内杂交。

(3) 如果合成探针与杂交的种系是同源的,且长度超过35bp,应采用更强的洗涤条件(如 1 × SSC或 0.5 × SSC)。

(4) 如果需要,滤膜可再次放射自显影。如果本底太高，可在较高温度或在更稀的 SSC 缓冲液洗涤滤膜(见步骤 6 和 7)。

(5) 滤膜可用另外的探针重复杂交两至三次。先用 80℃ 含 1% 甘油的水洗去以前杂交的放射性，洗 2 分钟,接着在室温用水洗几次。滤膜此刻已准备好,可用于再杂交。

参考文献

Anshelevich, V. V., Vologodskii, A. V., Lukashin, A. V., and Frank-Kamenetskii, V., *Biopolymers*, **23**: 39, 1984.

Bonner, T. I., Brenner, D. J., Nenfeld, B. R., and Britten, R. J., *J. Mol. Biol.* **81**: 123, 1973.

Britten, R. J., Graham, D. E., and Nenfeld, B. R., *Meth. Enzymol.* **29**: 363, 1974.

Cantor, C. R., and Schimmel, P. R., Biophysical Chemistry, W. H. Freeman, San Francisco, 1980, p. 1109.

Lathe, R., *J. Mol. Biol.* **183**: 1, 1985.

（刘亚霞译　姚志建校）

第7章 用质粒衍生的探针探测核酸

7-1 缺口翻译

提要

缺口翻译反应常用于将放射性磷酸核苷酸引入未标记的DNA，从而制备探针。此反应基于 DNA 聚合酶 I 启动未标记DNA中作为缺口暴露的游离3′-OH端DNA合成的能力。缺口是通过将待标记的DNA用DNase做有限消化而产生，其位置是随机确定的。聚合酶利用标记的三磷酸盐按5′→3′方向合成新的DNA。因此这种新聚合的DNA是带有放射性的。

实验所需时间

DNA 探针纯化后的2小时

试剂

DNA 酶 I (DPFF 级，Cooper Biomedical)：以 1mg/ml 浓度溶于 5 mmol/L $CaCl_2$ 和 1mmol/L $MgCl_2$ 的溶液中。以 5μl 为一份贮存在 −20℃；每个包装仅用一次。

活化缓冲液

10mmol/L Tris，pH7.4

5mmol/L $MgCl_2$

1mg/ml BSA，Pentax 组分V

贮存在 −20℃

DNA 聚合酶 I，5U/μl(BM，贮存在 −20℃)

3mol/L 醋酸钠，pH7.4

SS-苯酚

缺口翻译缓冲液

0.5mol/L Tris，pH7.4

0.1mol/L $MgSO_4$

1mmol/L DTT

500μg/ml BSA，Pentax 组分 V

以 0.5ml/每个包装贮存在 −20℃

酵母 *tRNA*，10mg/ml

未标记的三磷酸盐混合物：200μmol/L dGTP、dATP、dTTP 溶于 pH7.4 的 50 mmol/L Tris 溶液，贮存在 −20℃

α-^{32}P-d CTP

氯仿

10% 三氯醋酸 -0.1mol/L 磷酸钠

95% 乙醇

方法

实验准备

制备用于缺口翻译的未标记的 DNA，通常是从一个载体上用 RE 切下的已克隆的 DNA 探针(见 8-2)。此组分经琼脂糖凝胶(见 9-1,9-2)或 5%聚丙烯酰胺凝胶(见 9-3)及电洗脱(见 9-3)纯化。为了从凝胶中进一步提纯 DNA 片段,不妨使用 Elutip 微型柱或 Nensorb 柱(见 10-3)[注释(1)]。另一方面，探针可由克隆的、带有质粒或噬菌体载体顺序的片段,经缺口翻译制造。

缺口翻译

1.将下列反应物加入一只1.5ml微量离心管[注释(2)]。将已制成的DNA探针(0.5μg)加水至总量 7μl。

1μl DNA 酶 I,用活化缓冲液 1:10 000 稀释(以 2μl 到 200μl，做连续两次 1:100 稀释)。用前即刻稀释。

4μl 未标记的三磷酸盐混合物(dGTP、dATP、dTTP 各 200μmol/L; 反应终浓度是每种核苷酸为 32μmol/L)。

2.5μl 缺口翻译缓冲液

0.5μl DNA 聚合酶 I

10μl(α-^{32}P-)dCTP(反应终浓度是 1—2μmol/L)[注释(3)]。

保温混合物总量是 25μl[注释(4)]。

2.在 14℃ 保温 20 分钟[注释(5)]。

纯化标记的探针

3.将小离心管放至冰中,加入下列试剂:

3mol/L 醋酸钠	20μl
H_2O	150μl
SS-苯酚	200μl
氯仿	200μl

4.盖上试管通过旋涡振动将反应物混匀,在微型离心机中离心 1 分钟分相。

5.保持试管在某一角度,将上层含水相转移至另一含 2.5μl tRNA 贮存液的微量离心管中,弃去下层有机相及此试管(此管有放射性)。

6.加 500μl 乙醇，旋涡振荡混匀。在冰中冷却试管 30 分钟，置微型离心机 4℃ 离心 10 分钟,弃上清液(带有放射性),保存管中沉淀物。

7.加 1ml 水溶解沉淀,经旋涡振荡混匀。

8.测定标记探针的活性,取 2μl 样品置一试管，管中加满 10% 三氯醋酸(TCA)。将此混合液通过玻璃滤膜(例如 Whatman GF/C)或硝酸纤维膜抽滤。将试管装满 TCA 并再次用滤膜抽滤。再将试管装满95%乙醇并过滤。在加热灯下烤干滤膜，用液体闪烁计数仪计数,测定探针的比活性。0.5μg DNA 样品的 1.0ml 悬浮液，其每 2μl 代表 1ng 标

记的DNA。比活性应是每纳克DNA 1—5 × 10^5cpm。在成功的缺口翻译中，标记物的20—40%被掺入至探针中。

9. 样品贮存在4℃或放入塑料屏蔽盒中冻存在 −20℃。样品能保存约1—2周，随时可用于杂交。

10. 算出需要多少微升的样品能提供约5 × 10^7cpm。用此量进行杂交(见下节)。

注释

(1) 探针的纯化着重是去除可以影响缺口翻译反应的琼脂糖。

(2) 这些试剂可沿着微量离心管内壁逐滴加入，最后滴加放射性"α-^{32}P-dCTP"，混匀，在微型离心机内离心。

(3) 采用适当预防措施妥善处理带有放射性的反应物和废物。为了制备高比活性的探针，应使用一种以上的标记dNTP。对未标记混合物做合适地调整，从中去掉相应的dNTP。

(4) 如果在大规模筛选中需要较多的探针，步骤1的反应体积可以加倍。

(5) 为了使缺口翻译系统最适化，最好测定出^{32}P达到最佳掺入DNA所需的时间，为此可用的方法是做一条时间曲线，测定不同时间^{32}P向0.5μg感兴趣的DNA中的掺入量。通常，合适地掺入(游离标记物掺入20—40%)在20—40分钟内达到。

参考文献

Rigby, P., Dieckmann, M., Rhodes, C., and Berg, P., *J. Mol. Biol.* **113**: 237, 1977.

7-2 DNA杂交(Southern印迹杂交)

提要

这是将由缺口翻译产生的^{32}P-标记的DNA探针，与经琼脂糖凝胶分离后转印到硝酸纤维膜上的DNA片段杂交的方法。本方法与将缺口翻译的探针与RNA印迹杂交(11-6)所用的方法一致。

实验所需时间

第1天：1小时

第2天：3小时

特殊设备

塑料袋封口器

放射自显影装置

试剂

鲑精子DNA贮存液，2mg/ml

10mol/L *NaOH*

2.0mol/L *Tris*，pH7.4

1.0mol/L *HCl*

杂交缓冲液-*N*

洗涤缓冲液A

20 × SSC	200ml
H_2O	1 780ml
10% SDS	20ml
配至 2L	

洗涤缓冲液 B

20 × SSC	5ml
H_2O	985ml
10%SDS	10ml
配至 1L	

方法

实验准备

经缺口翻译(7-1)制备 ^{32}P-标记的 DNA 探针并配制洗涤溶液。

对滤膜的预杂交

1. 将 20 × 20cm 取自 DNA 印迹的硝酸纤维滤膜，放置并铺平在加热可密封的聚乙烯袋内。膜上倒入 20ml 杂交缓冲液-N[注释(1),(2)]。排出袋内所有的气泡,并将缓冲液覆盖在滤膜上。室温放置至少 5 分钟,或直至准备好探针。

双链探针的变性

2. 将适当体积的探针样品(相当于 1—5 × 10^7cpm)放入 50ml 塑料螺旋盖的试管中。
3. 依次加入下列试剂:
   a. 500μl 鲑精子 DNA 贮存液。 Function ?
   b. 50μl 10mol/L NaOH，直接加入样品。
   c. 300μl 2mol/L Tris, pH7.4。
   d. 475μl 1mol/L HCl,逐滴加入,边加边轻轻旋转混匀。

杂交

4. 将 10ml 杂交缓冲液-N 加入试管,将管中的内容物加至步骤 1 的袋内。加热封闭袋口(20-2)。
5. 浸泡在 42℃ 水浴保温过夜。

次日

6. 从袋内取出滤膜,将其放置在塑料盘内,重新密封袋口并弃入放射性废物中。在室温用 500ml 洗涤溶液 A 漂洗滤膜 5 分钟。倒去缓冲液,用新鲜缓冲液洗 3 次以上,每次间隔 20 分钟。
7. 随后用洗涤液 B 洗滤膜 2 次,每次 20 分钟,45—65℃[注释(3)]。
8. 将滤膜放在两层 Whatman 3MM 滤纸或纸巾之间,吸干。 空气中干燥滤膜约 30 分钟。
9. 将干燥滤膜重新放入可密封的袋内或放在一张 20 × 20cm Whatman 3MM 滤纸上;用透明的塑料膜覆盖。用 ^{35}S 墨水在粘性标签上标出滤膜方向。

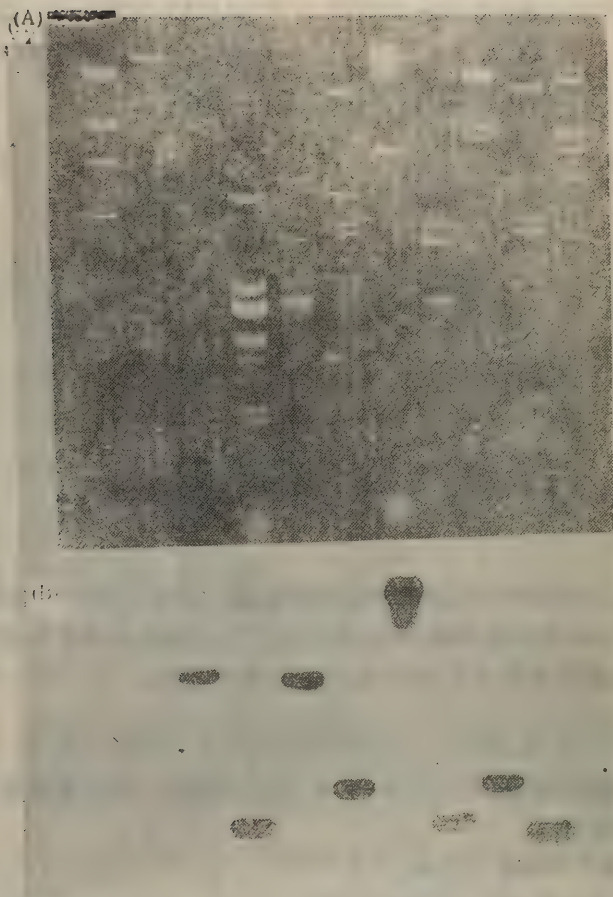


图 7.1 A. 溴乙锭着染的琼脂糖凝胶中的 DNA，在紫外线照射下肉眼可见。采用限制性内切酶切开来自一个基因组文库的质粒，并将样品进行凝胶电泳。注意切割后 DNA 的特定谱带和左侧一行 *Hind* III 切割的 λDNA 标志。B. 同类凝胶的 Southern 印迹的放射自显影。将琼脂糖凝胶转印至硝酸纤维素膜上，用末端标记的寡核苷酸探针与印迹杂交，从而鉴定基因组文库的哪段碎片可用于进一步研究。

10. 用 Kodak XAR-5 胶片和增感屏在 −70℃ 进行放射自显影。曝光过夜并显影(20-5)[注释(4)]。

注释

(1) 杂交缓冲液太少可导致背景过深。通常，对一张 20×20cm 滤膜，用 20ml 含探针的杂交缓冲液是足够的。对一片较大的印迹，需加入更多缓冲液，一般常规以 30ml 体积较好。

(2) 每袋可装一张以上的滤膜，推荐以 10 张圆滤膜为最大限额。

(3) 洗涤温度将决定信号/噪音比值。在较高温度下将得到更强的洗涤(本底降低)。探针与 DNA 的同源性、探针的长度，以及盐浓度也可影响信号/噪音比值。对每一特定情况下的洗涤条件要做调整。

(4) 如果想要曝光较多一些或较少一些，可在合适的时期内反复进行放射自显影。如果背景太深，返回步骤 7，按较强的条件(即稍高的洗涤温度)重复洗涤。

参考文献

Wahl, G., Stern, M., and Stark, G., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 76: 3683, 1979.

(刘亚霞译　姚志建校)

第 8 章　质粒 DNA 的制备

8-1　细 菌 的 转 化

提要

细菌的转化是这样一个过程：用环状 DNA质粒转化细菌细胞，质粒含有一个自主的DNA 复制源和一个可供选择的标志(如抗生素耐药性)。通过在 $CaCl_2$ 中保温，使缓冲液中的DNA 能透入处于对数生长期的细胞。短暂的热冲击可以加速这种参入。然后，在含抗生素的琼脂板上筛选参入了质粒 DNA 的细菌细胞。不含质粒的细胞将不能在这些平板上生长，转化成功的细菌将形成分散的菌落。

实验所需时间

第 1 天：6—7 小时

第 2 天：1 小时

试剂

LB 培养基(灭菌)

50mmol/L $CaCl_2$ (灭菌)

高压灭菌的甘油

LB-琼脂-抗生素平板(所用抗生素取决于载体，见 20-6)

方法

实验准备

对pBR322衍生质粒，选用菌株LE392、HB101、JM103、JM107 或 JM109。为了得到一个可保存的菌落平板[注释(1)]，LE392 或 HB101 在 LB 平板上划线接种、JM103、JM107 或 JM109 在一个基本琼脂平板上划线接种。琼脂平板的制备方法见 21-6。为了转化细胞，先要得到含所需插入片段的纯化的环状质粒(制备、购买或赠品)。为选择转化子必须制备LB培养基-琼脂-抗生素平板。选用合适的抗生素(见 20-6)。

细菌细胞的生长 [注释(2)]

1. 将 40ml LB 培养基加到无菌培养瓶中，瓶口在火焰上灭菌[注释(3)]。
2. 在火焰上方灭菌消毒金属接种环。接触琼脂边缘使环冷却[注释 (4)]，用环从贮存平板上刮取细胞(一个菌落)。
3. 将细胞转到培养基并抖落环上的细胞。培养瓶放入 37℃ 摇床。
4. 细胞生长到 600nm O.D. 为 0.3—0.5时，需要几个小时[注释(5)]。

5. 细胞在室温 2 500 × g 离心 5 分钟。

6. 细胞沉淀轻轻悬浮在 2—4ml 50mmol/L $CaCl_2$ 中，用 50mmol/L $CaCl_2$ 把悬浮液补到原来体积的一半(约 20ml)。细胞现在是非常脆弱的。

7. 冰浴保温 30 分钟。此时这些细胞被称为活化的细胞[注释(2)]。

8. 细胞在 4℃2 500 × g 离心 5 分钟。悬浮在 1/10 原体积(4ml)的冷 50mmol/L $CaCl_2$ 中。为了增加活性，使用前细胞在 4℃ 放置过夜。两天后细胞活性将降低。

9. 在一个无菌试管中，将约 0.1μg 质粒载体 DNA 或连接的质粒载体与 200μl 按步骤 8 制备的活化细胞混合。

10. 冰浴 30 分钟。

11. 将试管转到 42℃ 水浴使细胞加热 2 分钟。 另一种可用的方法是 37℃ 水浴 5 分钟。

12. 加入 1ml LB 培养基并在 37℃振摇或旋转培养 45 分钟，使抗生素耐药基因表达。

细胞的接种

13. 用末端弯曲的玻璃棍[注释(6)](用70% 酒精和火焰灭菌)在LB-琼脂-抗生素平板表面接种细胞。在不同的平板上接种不同的量(例如：50、100 和 200μl)，根据经验测定出为产生适当的分散菌落所需的量。如果需要的话，在 4℃ 贮存剩余的细胞以供下次接种。

14. 加 100μl 从步骤 8 得到的未转化的细胞到另一块含抗生素的平板上作为阴性对照。

15. 将平板放入 37℃ 孵箱，琼脂面朝下，放 20 分钟使培养基干燥。

16. 将平板倒置(琼脂面朝上)，37℃ 培养过夜。在 12—16 小时出现集落。

17. 菌落现已可用于菌落杂交(15-3)、质粒的微量 DNA 分析(8-4)、质粒的制备性生长(8-2 和 8-3)或保存。

转化细菌的长期保存：甘油保存

18. 用无菌接种环从平板上取出单菌落的细胞，加到含 2ml LB 培养基和相应抗生素的单个试管中。振摇培养直到培养物变浑浊。

19. 每管取 0.8ml 细胞并放在无菌小试管中。每管加 0.2ml 无菌甘油，混合，冻存于 −70℃。将甘油贮存物在相应的 LB 琼脂-抗生素平板上划线能重新得到细菌转化物。

注释

(1) 贮存细菌的琼脂平板可在 4℃ 保存大约 1 个月。平皿边缘用胶带或塑料膜封好。

(2) 冻存的活化细胞(例如 HB101)也可从 BRL 或 Vector Cloning Systems 购买。使用这些细胞时可参阅供应厂商提供的说明书。

(3) 下面各步均以此法灭菌。所有转移必须保持无菌。使用前对所有试管高压灭菌。

(4) 也可用无菌塑料接种环(不用火焰灭菌)。

(5) 为了达到最适的转化效率，细胞生长处于对数期是非常重要的。

(6) 形状类似于平底曲棍球杆。

参考文献

Cohen, S., Chang, A. C. Y., and Hsu, L., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **69**: 2110, 1973.
Dagert, M., and Ehrlich, S., *Gene* **6**: 23, 1979.

8-2 质粒 DNA 的制备：Triton-溶菌酶法

提要

本法用于从大肠杆菌中制备质粒 DNA(或任何小的环状 DNA，例如 M13 RF DNA)。用溶菌酶和 Triton 使细胞部分裂解，使质粒逸出细胞壁进入上清液。而较大的大肠杆菌染色体 DNA 则被细胞壁挡住。除去裂解液中的细胞碎片，含质粒的上清液在 CsCl-溴乙锭平衡梯度上分离，从线状质粒或大肠杆菌 DNA 片段中纯化环状 DNA。线状和环状 DNA 区带在这种梯度上处于不同密度。这是一个制备没有 RNA 污染的高纯度质粒 DNA 的常用方法，但费时间并需要特殊的超离心设备(垂直转头和超离心机)。

实验所需时间

第 1 天：2—3 小时
第 2 天：1 小时
第 3 天：5 小时
第 4 天：1 小时
第 5 天：3 小时

特殊装置

超离心机 (Du Pont/Sorvall TV850 和 TV865 或 Beckman VTi50 和 VTi65 垂直转头，盖子和扳手)

折光仪

Biodryer 装置(真空离心机)

快封超离心管和封口器或 Du Pont/Sorvall 管弯曲系统

快封管 (Beckman)；VTi50-25 × 89mm；VTi65-13 × 51mm 管或 Du Pont/Sorvall VT850，VT865 弯顶管

试剂

M9-葡萄糖基本培养基的成分见下面步骤 1，氯霉素按 34mg/ml 溶于乙醇 (贮于－20℃)

10% 蔗糖溶于 50mmol/L Tris，pH8.0 中

溶菌酶溶液(30mg/ml H_2O)，使用前新鲜配制

1% Triton X-100

CsCl 溶液(19g 光学纯 CsCl 与 20ml H_2O 混合)

溴乙锭 10mg/ml

0.5 mol/L *EDTA*，pH8.0

3mol/L 醋酸钠，pH7.4

SS-苯酚



图 8.1 质粒的制备。选择感兴趣的质粒并使其大量扩增。使质粒 DNA 从细菌中游离出来，通过连续两次 CsCl 离心分离质粒 DNA。

TE 缓冲液
正丁醇(水饱和)
氯仿

方法

实验准备

取一个菌落到 20ml 含相应抗生素的 LB 培养基中[注释(1)]37℃振摇培养过夜。

培养基配制

1. 配制细菌生长的基本培养基(M9-葡萄糖)的 5 种成分:
   a. $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 60g
   KH_2PO_4 30g
   NaCl 5g
   NH_4Cl 10g
   溶解在 900ml 水中并用 10mol/L NaOH 调 pH 至 7.4。
   b. 20g 葡萄糖加水到 100ml,灭菌。
   c. 100g 酪蛋白水解氨基酸(酪蛋白水解物)加水到 1L。
   d. 1mol/L $MgSO_4$。
   e. 1mol/L $CaCl_2$。
2. 上述溶液除 b 外,分别高压灭菌,冷却。
3. 将溶液 a 和 b 加在一起(单独的 a 是10 × M9; a 加 b 是 10 × M9-葡萄糖)。
4. 制备 1L 基本培养液:
   a. 800ml 无菌水。
   b. 加1ml 1mol/L $MgSO_4$ 和 0.1ml 1mol/L $CaCl_2$。混合。
   c. 加 100ml 从步骤 3 得到的 a/b 混合液。
   d. 加 100ml 溶液 c。
   e. 加相应抗生素[注释(2)]。

接种培养基

5. 20ml 原先在含相应抗生素(见实验准备)的 LB 培养基上生长过夜的细胞,加到放在 2.5L 硬底烧瓶或 4L 三角烧瓶中的 1L 基本培养基里。

6. 振摇培养直到 600nm O.D. 为 0.8 [注释(3)]。2小时后每 30 分钟检查一次 O.D.。

7. 当 O.D. 达到 0.8 时,加入 5ml 氯霉素溶液使细菌 DNA 复制停止,而扩增质粒的复本数。

8. 37℃在摇床上以 120rpm 摇动过夜。

收集

9. 细胞在 4 个 250ml 或 2 个 500ml 离心管中于 4℃ 4 000 × g 离心 5 分钟。弃去上清液。

10 在 10ml TE 缓冲液中悬浮细胞并合并，转到透明的聚碳酸酯超离心管中（例如 Ti50.2 带螺旋盖的管子）。

11. 4℃ 4 000 × g 离心 5 分钟。

12. 沉淀悬浮在 8ml 10% 蔗糖(配在 50mmol/L Tris, pH8)中。

13. 加 1ml 新配制的溶菌酶溶液消化细胞壁上的肽聚糖键。混合后冰浴 10 分钟。

14. 加 2ml 0.5mol/L EDTA 螯合二价阳离子和抑制 DNA 酶。混合后冰浴放置 5 分钟。

15. 加 5ml 1% Triton X-100 (配在水中)，混合。37℃ 温热 2 分钟或直到发生裂解。当粘度增加和细菌碎片可见时，说明裂解出现。

16. 4℃ 192 000 × g 离心 30 分钟(即用 Beckman Ti50.2 或 Du Pont/Sorvall 转头，转速 40 000rpm)。

17. 上清液(澄清的裂解液)倒入 50ml 有盖管中。用水加到 20ml 体积，加 19g CsCl，混合到 CsCl 溶解。

18. 2 000 × g 离心 5 分钟。

19. 用棉花拭子除去顶部蛋白质层。

20. 取 10μl 用折光仪检查折光指数，此时应该等于 1.395—1.400。如果需要，加水或 CsCl 调节折光指数。

21 加 400μl 溴乙锭溶液到剩余的液体中 [注释(4)]。

22. 转到可以封口的离心管中。用液体石蜡补满管体积，封管，在垂直转头上于 20℃ 225 000×g 离心过夜(例如 Beckman TVi50 或 Du Pont/Sorvall TV850，转速 48 000rpm)。管子是 Beckman polyallomer 热封管 25 × 89mm 或 Du Pont 弯头管，35ml。

第二天

23. 不用刹车的条件下停止离心，用紫外线检查 2 条区带。除去管顶部或用 18 号针头刺入顶部。试试 2ml 注射器芯，看是否易于移动。在较低区带下 5mm 处用 18 号针头刺破管壁，连接注射器。瞄准并用注射器取出较低的区带[注释(5)]。将收集的材料放在较小的超离心管中(例如 Beckman Quickseal 13 × 51mm 管)加 CsCl 溶液至顶部 [注释(6)]。封管。

24. 18℃ 278 000 × g 至少离心 8 小时 (Beckman VTi65 或 Sorvall TV865 转头，转速为 54 000rpm)。

次日——质粒抽提

25. 不用刹车的条件下停止离心。在紫外灯下看区带。以步骤 23 所述的针取出区带(如果有 2 条带则取较低的带)，放入 10ml 有盖聚丙烯管中。带的体积大约应为 1ml。

26. 每毫升 CsCl 带溶液加 3ml TE 缓冲液。

27. 加 4ml 正丁醇，混合，稍离心使相分离。真空抽吸除去上层正丁醇。由于溴乙锭存在使正丁醇为橙色的。

28. 如步骤 27 用 4ml 正丁醇再抽提 3 次。橙色消退，但界面依然可见。

29. 将下层水相转到 30ml Corex 管中。

30. 对每毫升原来的 CsCl 带溶液(步骤 25),加 8ml 乙醇。混合。置冰浴 20 分钟。不得在干冰中冷却;较低的温度将使 CsCl 沉淀。

31. 4℃,12 000× g 离心 10 分钟。

32. 弃去上清液,从沉淀上吸去过量液体。沉淀重新悬浮在 350μl TE 缓冲液中。转到 1.5ml 微量离心管中。另外用 100μl TE 缓冲液淋洗 Corex 管并加到微量离心管里。

33. 加 0.5ml SS-苯酚和 0.5ml 氯仿。混合,在微量离心机上离心 2 分钟。 上层水溶液转到新的微量离心管中。

34. 加 50μl 3mol/L 醋酸钠,混合。

35. 加 1ml 乙醇,混合。置冰浴沉淀 10 分钟。

36. 在微量离心机中于 4℃ 离心 5 分钟。

37. 弃去上清液,用 500μl 80% 乙醇洗沉淀,旋涡混合器混合。 在微量离心机中 4℃ 离心 5 分钟。

38. 弃去上清液,真空离心机中干燥沉淀。

39. 沉淀重新悬浮在 500μl TE 缓冲液中。

40. 加 5μl 样品到 1ml 水中。在 260nm 测 O.D.以定出 DNA 浓度(20-3)。

41. 样品贮存在 -20℃。样品是非常稳定的。

注释

(1) 对 pBR 衍生的质粒常用的抗生素是四环素或氨苄青霉素。 抗生素的选择取决于质粒内插入物的部位。 DNA 插入到这些部位将钝化氨苄青霉素或四环素基因。 对氨苄青霉素每毫升培养基用 50μg;对四环素用 12.5μg/ml。

(2) 见注释(1)。

(3) 光散射测量细胞密度。将培养基放在分光光度计 600nm 调仪器为零,读样品的 O.D.(20—3)。

(4) 溴乙锭是一个致突变剂,需小心地操作。

(5) 上面的区带是线状细菌染色体,有缺口的环状和线状质粒 DNA。第二条带(要保留的带)是所需的环状质粒 DNA。

(6) 如果溶液不呈粉红色,加 20μl 溴乙锭。

参考文献

Clewell, D., and Helinski, D., *J. Bacteriol.* **110**: 1135, 1972.
Radloff, R., Bauer, W., and Vinograd, J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **57**: 1514, 1967.

8-3 大规模碱裂解法: 质粒的纯化

提要

本法用于从适合于大部分分子生物学工作的大肠杆菌纯化质粒DNA。它与Triton-溶菌酶法相比,主要优点是在纯化过程中不需要超离心,需要的时间少。这个方法的唯一缺点是在最终产物里有少量大肠杆菌染色体 DNA 和 RNA,影响用 O. D. 测量法精确定量质粒。

实验所需时间

细菌生长后一天

特殊装置

1 × 25cm Sepharose 4B 柱

试剂

溶液A

50mmol/L 葡萄糖

10mmol/L EDTA

25mmol/L Tris，pH8.0

溶液B

溶菌酶 20mg/ml 溶于溶液A（每次使用前新鲜配制）

溶液C

0.2mol/L NaOH

1% SDS

溶液D

29.4g 醋酸钾

11.5ml 冰醋酸

加水到 100ml

Sepharose 4B 在 4B 缓冲液中预先溶胀

4B 缓冲液

0.5mol/L NaCl

50mmol/L Tris，pH7.4

10mmol/L EDTA

3mol/L 醋酸钠 pH7.0

0.3mol/L 醋酸钠，pH7.0

RNA 酶 A，10mg/ml(70℃ 加热 10 分钟，钝化 DNA 酶)

SS-苯酚

氯仿

异戊醇

乙醇

TE 缓冲液

溴乙锭，10 mg/ml

方法

实验准备

如 8-2 步骤 1 到 8 所述，制备性培养 250ml 含质粒的大肠杆菌。

预先在 4B 缓冲液中溶胀 Sepharose 4B,装入 1 × 25cm 柱内。

步骤

1. 在 500ml 离心管中以 4000×g 离心 5 分钟，从 250ml 培养物中收集细胞。弃去上清液。

2. 细胞沉淀悬浮在 2ml 溶液 A 中,转到 10ml 有扣盖的聚丙烯管中。

3. 加 0.5ml 溶液 B,彻底混匀。冰浴 10 分钟。

4. 加 5ml 溶液 C,轻轻混匀。冰浴 10 分钟。

5. 加 4ml 溶液 D,旋转混合。置试管于冰浴 10 分钟。

6. 在 Corex 或有扣盖的聚丙烯管中 12 000 × g 离心 10 分钟,离下白色沉淀。

7. 上清液转到新管。小心不要转入任何沉淀! 弃去沉淀。

8. 上清液中加入热处理过的 RNase A,最终浓度为 20μg/ml。 室温放置 15 分钟。

9. 用等体积 SS-苯酚: 氯仿(1:1)抽提。12 000 × g 离心 10 分钟使二相分离。上层水相转到新管。重复抽提几次。

10. 上层水相转到新管并用等体积氯仿抽提。12 000 × g 离心 2 分钟分相,将上层水相转入新管。

11. 加 1/10 体积 3mol/L 醋酸钠(pH7.0) 和 2.5 倍体积乙醇。冰浴10分钟沉淀核酸。12 000 × g 离心 10 分钟收集沉淀。弃去上清液，沉淀重新悬浮于 1ml 4B 缓冲液，加到 1 × 25cm Sepharose 4B 柱上,用 4B 缓冲液洗柱[注释(1)]。

12. 1ml 为 1 管分部收集。在 260nm 处测 O. D.(20-3)以监测哪一部分含质粒 DNA。质粒 DNA 在柱上流出的第一个峰中(此峰在空体积流出,一般是第3—8管)。污染的RNA可能出现在后面的一些管子中,其出现的位置取决于 RNA 酶的效率。

13. 合并所有含质粒的部分。用等体积 SS-苯酚:氯仿(1:1)抽提合并的样品,12 000×g 离心 2 分钟分相,上层液转入新管。

14. 加 2 体积乙醇。干冰中放置 10 分钟沉淀 DNA。12 000 × g 离心 10 分钟离下沉淀,轻轻倒出上清液并弃去。

15. 沉淀重新悬浮在 0.4ml 0.3mol/L 醋酸钠(pH7.0)中。转到微量离心管中,加0.8ml 乙醇。干冰中放置 10 分钟以沉淀 DNA。在 4℃ 微量离心机中离心 5 分钟收集 DNA。倒出上清液并弃去。

16. 以 0.5ml 80% 乙醇洗涤沉淀。4℃ 离心 5 分钟，弃去上清液。 沉淀于空气中干燥,重新悬浮在 TE 缓冲液中。在 260nm 测 O. D.(20-3)以测定 DNA 浓度 [注释(2)]。-20℃贮存 DNA,样品非常稳定。

注释

(1) Sepharose 柱步骤 11 和 12 可以用 P. Krieg 和 D. Melton 的聚乙二醇沉淀法代替，使质粒从小核苷酸中分离出来。

(2) 含质粒的部分也可用溴乙锭琼脂糖平板鉴定。加 0.4g 琼脂糖到 40ml TE 缓冲液中制备平板。溶液煮沸 1 分钟。冷却到 60℃ 左右并加入 4μl 溴乙锭溶液,将溶液倒入平皿,待琼脂固化。 每份样品取 5μl 点在平板上,20 分钟后点的样品进入平板,用紫外灯照平板,含质粒的部分在第一峰,溴乙锭染色阳性(通常是 3—8 管)。

8-4 质粒的“微量制备”法

提要

质粒“微量制备”法对于从若干转化体中制备少量部分纯化的质粒 DNA 是很有用的。它根据碱性 SDS 裂解使质粒 DNA 从细胞中释放出来，而大肠杆菌染色体 DNA 留在细胞壁碎片上。从溶液中除去细胞壁碎片后，保留上清液，然后由仍含有大量大肠杆菌 DNA 的上清液中提纯质粒 DNA。在大规模培养前，这个方法能提供足够的部分纯化的质粒DNA，用于质粒的快速分析性酶切分析（如果需要可用于 Southern 印迹杂交）。当需要少量质粒 DNA（如 10μg）而不是大量（如几百毫克）质粒 DNA 时，也可以用这个方法。

实验所需时间

2 小时

试剂

LB 培养基

葡萄糖缓冲液

25mmol/L Tris，pH8.0

50mmol/L 葡萄糖

10mmol/L EDTA

溶菌酶溶液（8mg/ml 配在葡萄糖缓冲液中）；使用前即刻将溶菌酶溶解在葡萄糖缓冲液中

异戊醇

0.2mol/L NaOH，含1% SDS（每次使用前新配）

5ml 10% *SDS*

44ml 水

1ml 10mol/L *NaOH*

醋酸钾溶液

29.4g 醋酸钾

11.5ml 冰醋酸

加水到 100ml

SS-苯酚

氯仿

3mol/L 醋酸钠，pH7.4

TE 缓冲液

方法

实验准备

选择一个菌落。用无菌接种环取出菌落，加到 20ml LB 培养基中（含相应抗生素）

[注释(1)]。37℃振荡培养直到培养物被饱和。

样品制备

1. 细胞 2 000 × g离心 10 分钟。
2. 沉淀悬浮在 450μl 葡萄糖缓冲液中。
3. 加 150μl 溶菌酶溶液，室温放置 5 分钟。
4. 转到 15ml Corex 离心管中
5. 加 1.2ml 含 1% SDS 的 0.2mol/L NaOH，混合。置冰浴 5 分钟。重新混合。
6. 加入 900μl 冰冷的醋酸钾溶液，混匀。
7. 4℃ 12 000 × g 离心 10 分钟。
8. 上清液倒入新的 Corex 管。小心不要转入任何白色沉淀。丢弃沉淀。
9. 加 1.5ml 异戊醇，旋涡振荡混合。
10. 置于 −20℃ 冰箱 15 分钟。
11. 4℃ 12 000 × g 离心 15 分钟。
12. 弃去上清液，沉淀重新悬浮在 400μl TE 缓冲液中，转到 1.5ml 微量离心管中。

样品抽提

13. 加 40μl 3mol/L 醋酸钠。
14. 用 SS-苯酚/氯仿抽提，乙醇沉淀 DNA，如 20-1 所示。
15. 弃去乙醇，沉淀在空气中干燥 5 分钟。
16. DNA 重新悬浮在 50μl TE 缓冲液中。
17. 现在质粒 DNA 可作进一步实验用[注释(2)]。
18. −20℃ 贮存质粒制品。

注释

(1) 氨苄青霉素(50μg/ml 培养基)或四环素(12.5μg/ml 培养基)取决于在所用质粒上插入物的部位。

(2) 虽然以这种方式分离的质粒 DNA 中同样发现有 RNA，但 RNA 并不干扰进一步的实验(例如 RE消化、亚克隆繁殖或连接反应)。由于 RNA 的存在，用测 O. D. 的方法定 DNA 浓度就不精确。为了测量质粒 DNA 的浓度，电泳酶切的质粒，然后与已知的标准 DNA 比较溴乙锭染色强度(例如 *Hin*dIII 切割 λ 噬菌体 DNA，见 9-1)。

参考文献

Birnboim, H., and Doly, S., *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513, 1979.
Ish-Horowicz, D., and Burke, J., *Nucleic Acids Res.* **9**: 2989, 1981.

(沈倍奋译　姚志建校)

第 9 章　DNA 限制性片段的制备

9-1　微 型 凝 胶

提要

微型凝胶对利用琼脂糖凝胶电泳迅速分离少量 DNA 片段是很有用的。当只有少量 DNA可用于分析时，或希望迅速监测操作过程中连续步骤间各种酶反应的效率时，它们显得特别有用。

实验所需时间

2 小时

特殊装置

微型胶水平电泳仪
电泳电源
紫外灯

试剂

1 × TAE 缓冲液
琼脂糖贮存液
　300ml1 × TAE 缓冲液含 0.8% 琼脂糖(2.4g)
　使用前用微波炉使其溶解
溴乙锭 10mg/ml

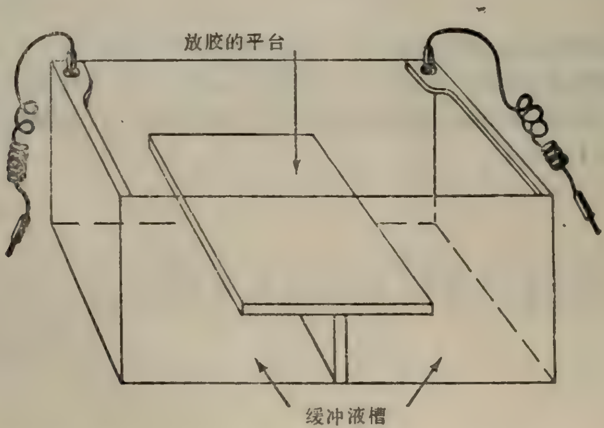


图 9.1　微型凝胶装置图。槽内注入缓冲液，胶放在中心平台上，使缓冲液刚盖过胶。样品加在胶上预先制好的孔中，两极接上电源进行电泳。

加样缓冲液

方法

1. 在微波炉中加热琼脂糖贮存液并冷却到 50℃，用 25ml 吸管取出 15ml(体积随电泳胶盒大小而变化)，多余的胶液以后用时可再加热；加水保持体积可能是需要的。

2. 轻轻放在清洁的微型胶板上，由于表面张力，15ml 胶应该留在平板上，如果需要边缘可封起来；较新的胶模上有预先形成的加样用的孔架。

3. 将形成加样孔的梳子加到适当的深度，即平板表面上方 1mm 处[注释(1)]。

4. 让胶固化(大约要 20 分钟)，除去梳子。

5. 将胶放入有 500ml1 × TAE 缓冲液(含50μl溴乙锭贮存液)的电泳槽内[注释(2)]。

6. 在微量离心管中向 8μl 样品(含100—500ng DNA)加入2μl 加样缓冲液[注释(3)]，短促离心以混合并收集样品。

7. 每孔加 10μl 样品。

8. 每块板上加 4μl *Hind* III 切割的 λcI857 DNA(250 ng/μl，再用 1μl 加样缓冲液)作为分子量标准(标准带是 23. 1、9.4、6.6、4.4、2.3、2.0、0.56 和 0.12)[注释(4)]。

9. DNA 从负极电泳到正极。

10. 80V 约走 1 小时，或直至溴酚蓝染料前沿走过 3/4 胶。

11. 取出胶，用水漂洗除去过量的溴乙锭。 在紫外灯上对胶照相以显示谱带。 照相后，如果需要更高的分辨率或更多的信息，凝胶可进一步电泳。此外，限制性片段能从胶上电洗脱下来作进一步分析(9-3)。

注释

(1) 自制的系统没有样品槽成形器的支持物，则需用一个样品槽成型梳，在灌胶以前用手指将它固定到桥上，定位于板的上方 2mm 处。通常这些平板的大小是 7×8cm。

(2) 溴乙锭是致突变剂。在操作胶和缓冲液时要小心并戴手套。

(3) 如果 λDNA 或 RE 消化的 DNA 被电泳，在加到胶上去以前将样品加热 65℃ 2 分钟，以使粘性末端变性。

(4) 参见注释(3)。

参考文献

Sanger, F., *et al.*, *J. Mol. Biol.* 162:729, 1982.

9-2 酶切后 DNA 片段的分析：琼脂糖凝胶电泳

提要

本方法叙述了较大规模的琼脂糖凝胶电泳的一些基本原理。大规模胶允许电泳走得较长和对片段的分辨力更好。此外，也能从质粒的制备性消化物中分离片段以制备 DNA 探针。这些胶适用于 Southern 印迹。与微型胶相比，它的缺点是需要电泳的时间较长。

实验所需时间

4 小时至过夜

特殊装置

水平琼脂糖凝胶电泳仪，样品槽成型梳，胶模(例如 BRL4 型)等。

试剂

40 × *TAE* 缓冲液

溴乙锭10mg/ml

加样缓冲液

方法

实验准备

制备待分析的经 RE 消化的 DNA(5-4)。用微型凝胶检查消化的进行程度是否合适(9-1)。

琼脂糖凝胶

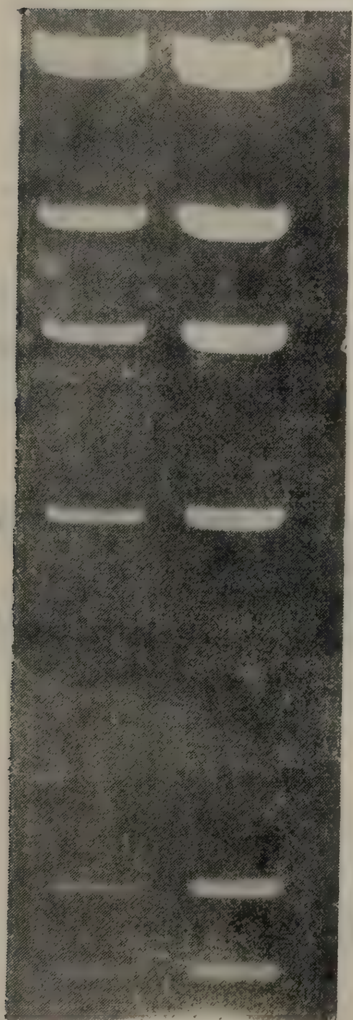


图 9.2 两种浓度的λ噬菌体(cI857)经 *Hind* III 消化后分离的 DNA 片段。

1. 如果 RE 消化是合适的，样品则可走较大规模的琼脂糖凝胶。胶的制作详见 5-5。这是一个 300ml、20 × 20cm 胶。所用琼脂糖的浓度随 DNA 片段大小而变化。0.8% 琼脂糖的胶对 1—25kb 的片段有很好的分辨能力。对大片段(例如 20—100kb)用 0.5% 琼脂糖。对小片段(例如 0.2—2kb)用 1.5% 琼脂糖。

2. 除了分离DNA片段外，琼脂糖凝胶能用来帮助测定 DNA 片段的大小。DNA片段的迁移率与它的碱基对长度的对数成反比，将待测片段移动距离与同时走的标准大小片段移动距离比较就能合理地精确测定片段大小(±5%)。

3. 对充分了解的质粒或噬菌体经 RE 消化，就产生大小已知的标准片段，并能用于测定未知 DNA 片段的大小(通过在半对数坐标纸上作的校正曲线)。片段大小(kb)画在对数的纵坐标上，迁移距离(cm)画在横坐标上作校正曲线。一些常用的标准片段如下［注释(1)］:

a. *Hind* III 切割 λDNA(λcI857Sam7)得到 8 个片段：23.1、9.4、6.6、4.4、2.3、2.0、0.56 和 0.12kb。

b. *Taq*I 切割 pBR322 得到 7 个片段，范围从 0.141 到 1.444kb:1444、1307、475、368、315、313 和 141bp。

c. *Bam*HI 切割 λcI 857 Sam 7 DNA 得到 6 个片段：16.8、7.2、6.8、6.5、5.6 和 5.5kb。

4. 在 1—2μg 的标准片段中加入 1/5 体积的加样缓冲液，像做样品一样操作。65℃加热 2 分钟，每个胶孔加 35μl。

5. 在 1×TAE 缓冲液中电泳胶在 40V 走 4 小时至过夜(5-5)[注释(2)]。在紫外灯下观察分离开的片段并照相(20-4)。

6. 现在胶可用于 Southern 印迹或片段的纯化。做 DNA 印迹和杂交(5-6 和 7-2)以确定与标记探针杂交的 DNA 片段。此外，为了纯化所需要的酶切片段，从胶上切下所需的区带。现在样品可以准备进行 DNA 的电洗脱(9-3)和以后的纯化。

注释

(1) 因为溴乙锭的强度与 DNA 长度和量成正比，因此通过比较样品与不同大小标准的强度能测出插入的量。

(2) 溴乙锭是一个致突变剂，小心地操作胶并戴手套。

参考文献

Aaij, C., and Borst, P., *Biochim. Biophys. Acta* **269**:1 92, 1972.
Sharp, P., Sugden, B., and Sambrook, J., *Biochemistry* **12**:3055, 1973.

9-3 电 洗 脱

提要

本方法用于从琼脂糖或聚丙烯酰胺胶中回收 DNA 片段。切下含 DNA 片段的胶并置于含缓冲液的透析袋中。电泳使 DNA 从胶内出来进入透析袋的缓冲液中。DNA 片段回收在缓冲液中。用 SS-苯酚/氯仿抽提和 Elutip 或 Nensorb 层析法(也可不用层析法)从污染物中纯化 DNA。以这种方法纯化的 DNA 片段适用于以后的连接反应，并能被大部分 RE 完全裂解。本法简单、快速，并且 DNA 回收率高。

实验所需时间

3—4 小时

特殊装置

微型胶装置和电泳电源
真空离心机(干燥样品用)

试剂

1mmol/L EDTA, pH8.0
Na_2HCO_3, 2%
0.2×TBE 缓冲液
SS-苯酚

乙醇

氯仿

TE 缓冲液

3mol/L 醋酸钠，pH7.4

透析袋(直径 13mm，购自 Spectrum 的 Spectrapor)

透析夹

方法

实验准备

准备透析袋:

a. 剪下 25cm 直径为 13mm 的透析袋。

b. 放到含 1mmol/L EDTA 的 2% Na_2HCO_3 中，加热至沸，并煮 1 分钟。

c. 冷却，用水淋洗透析袋 3 次。

d. 用乙醇洗透析袋 2 次。

e. 用 1mmol/L EDTA，pH8.0 洗 2 次。

f. 在 4℃ 1mmol/L EDTA，pH8.0 中保存。

在切胶之前照相。

1. 从琼脂糖凝胶(9-2)或丙烯酰胺凝胶(9-4)切下所需区带（紫外线激发溴乙锭显示区带)。用一个未用过的安全剃刀切下每条区带。

2. 将各区带分别放入透析袋(袋一端先行夹住或扎紧)，加入 450μl 0.2 × TBE 缓冲液。从袋内赶出所有空气并用第二个夹子夹住。切掉多余的袋，检查透析袋是否漏。

3. 将透析袋放在水平琼脂糖或微型胶盒内，加入 0.2 × TBE 缓冲液使之正好盖过透析袋，将袋(长轴)放成与电极间的连线垂直。如果用一个以上透析袋时，用夹子或带扎好，以保持 DNA 样品的电泳通道。

4. 300V 电洗脱 1—3 小时[注释(1)]。DNA 从胶内出来并留在透析袋内[注释(2)]。颠倒正负极，继续走 1—2 分钟使 DNA 脱离透析袋壁。

5. 用小吸管尖小心地取出袋内的溶液并置于 1.5ml 微量离心管中，另外加 450μl TBE 缓冲液淋洗透析袋，与原来的溶液合并。小心不要取出胶碎片。

6. 现在每个样品大约 900μl。在微量离心机上离心 15 秒使胶碎片沉淀。分 2 次各 450 μl 转到 2 个 1.5ml 微量离心管中[注释(3)]。

7. 用 SS-苯酚/氯仿抽提 DNA，用乙醇沉淀 DNA(20-1)，或用 Nensorb 柱纯化 DNA (10-3)。

8. 在真空离心机中真空干燥沉淀。约需 5 分钟。

9. 每管加 25μl TE 缓冲液。合并从一条带来的两部分。

分析

10. 为了测定 DNA 的浓度，将几微升样品与 1μl 加样缓冲液混合进行微型胶电泳。同时加已知浓度的标准分子量标志(9-3)。比较洗脱片段与标准之间溴乙锭染色强度就可以大致测出样品的浓度。除了定量外，这个方法也能鉴定洗脱片段的纯度。

贮存

11. 当贮存在 -20℃ 时,样品是非常稳定的。现在能用于接入质粒和 M13 载体或做缺口翻译[注释(4)]。

注释

(1) 电洗脱可在 4℃ 进行避免样品发热。

(2) 因为 DNA 能被溴乙锭染色,能用紫外光源来看有 DNA 的胶。洗脱时间根据 DNA 片段大小决定,大的 DNA 片段所需时间较小片段长。溴乙锭能从透析袋中扩散出来,但 DNA 则留在袋内。

(3) 如果预期每管 DNA 产量小于 5μg,则可加 1μl 10mg/ml 酵母 tRNA 载体以减少丢失。

(4) 如果在以后的操作中片段走不好,与胶有关的杂质可用 Nensorb 或 Elutip 方法除去(10-3)。

9-4 DNA 限制性片段的聚丙烯酰胺凝胶电泳

提要

本法用于分离小的 DNA 片段(如: 50—2 000bp),通过与已知长度的片段比较能精确测定它们的长度。此法对产生小片段的 RE 酶切图谱分析很有用。通过胶纯化和以后的电洗脱(9-3)也可制备这些小的DNA片段。用这种方法制备的片段能很好地用于以后的连接反应或缺口翻译(7-1)。

实验所需时间

4 小时

特殊装置[注释(1)]

电泳电源

垂直凝胶制胶的板和垫片

垂直电泳槽

样品槽成形梳

试剂

10%丙烯酰胺溶液

95g 丙烯酰胺[注释(2)](BioRad)

5g 双丙烯酰胺[注释(3)](BioRad)

加水到 1L

加热到 50℃ 搅拌使之溶解,避光贮存于 4℃

20 × *TBE* 缓冲液(室温贮存)

10%(w/v)过硫酸铵(BioRad),每周新鲜配制并贮存于 4℃

TEMED(N,N,N′,N′-四甲基乙二胺),贮存于 4℃

丙烯酰胺凝胶加样缓冲液

50% 甘油

1 × TBE

0.5% 溴酚蓝

0.5 %二甲苯蓝

溴乙锭，10μg/ml

方法

实验准备

制备供分析的 DNA 样品。例如，样品可以是RE消化的 λ 噬菌体或在质粒载体中克隆的 DNA (5-4)，或是用 *Eco* RI 切割的准备按分子大小划分的 c DNA 插入物(14-2)。样品体积应该在 10—100μl 之间。

制备标准分子量 DNA。对于典型的聚丙烯酰胺凝胶电泳，用 *Eco* RI 和 *Hin* fI 使 5μg pBR322 裂解成一系列很好的标准(998、634、517、506、396、344、298、221、220、154 和 75bp)。为了得到较大的片段，可以加入用 5μg *Hin*d III 切割的 λcI 857 DNA (23.1、9.4、6.6、4.4、2.3、2.0、0.56 和 0.12kb)。

制凝胶前装好平板和垫片，涂薄薄一层凡士林或真空油脂封垫片使之不漏水。另一种方法是熔化1%琼脂糖，用注射器沿垫片注入。夹住垫片以保持平板的位置。

必要时，可以测量一下胶板与垫片之间空腔的体积，证实空腔是不漏水的。

操作步骤

1. 制备适量凝胶，使之略多于胶板间空腔体积。

100ml 5%胶:

10%丙烯酰胺溶液	50ml
水	44ml
20 × TBE	5ml

轻轻搅拌使之混合。

2. 在将胶混合液加入空腔前，加 1ml10% 过硫酸铵和 75μl TEMED。用 50ml 没有针头的注射器轻轻混合，加入空腔内，完全注满。

3. 立即将样品槽成型梳插入腔顶并夹紧，这样形成加样槽。

4. 待胶聚合(15 分钟至 1 小时)。

5. 聚合后，除去底部垫片和梳子，将胶固定在电泳装置上。

6. 上下槽注入 1 × TBE 缓冲液，淹过上面的加样孔。赶掉下槽中胶底部的所有气泡。

7. 测量一下要加入的样品体积，加 1/5 体积的加样缓冲液[注释(4)]。

8. 用玻璃微量吸管小心加入配在加样缓冲液中的样品，使样品在孔底成一层。

9. 每厘米胶用 2—10V 电压电泳。电泳时间要足够长，使样品中感兴趣的片段能分开。作为指示，在 5% 胶中溴酚蓝染料前沿与约 50bp 的 DNA 片段一起移动，而二甲苯蓝染料前沿与 400bp 片段一起走。

10. 关掉电泳电源，将胶从电泳槽中取出。

11. 分开 2 块平板，胶粘在其中一块平板上。如果标同位素(步骤 12)可用放射自显影

方法检测分离的 DNA,或用溴乙锭染色法(步骤 13)。

12. 放射自显影可在"湿胶"进行,将胶用清洁的塑料膜包裹,并与 XAR-5 胶片一起放在匣中。另一种方法是将胶转到 Whatman 3MM 滤纸上,盖以清洁的塑料膜。进行放射自显影,或在干胶机上干燥后再进行放射自显影(20-5)。

13. 用溴乙锭染色时,对仍然粘在平板上的胶,小心地在胶面上加 50—100ml 溴乙锭溶液(10 μg/ml),使溴乙锭扩散到胶中,染 DNA 15 分钟。轻轻地用水从胶面上洗去过量染液,盖以清洁的塑料膜,在紫外灯下看 DNA (塑料膜对着紫外光源,因为玻璃会吸收紫外线)。现在可以对胶进行照相(20-4)。

14. 用新的安全剃刀从胶上切下已确定的片段 (步骤 12 或 13),并通过电洗脱回收(9-3)。

注释

(1) 这些器材有多种商品供应,或根据设计在玻璃和塑料商店里割成所需要的大小。

(2) 戴手套,小心不要吸入或接触未聚合的聚丙烯酰胺,这种化合物是一种神经毒物。

(3) 如果需要, Bacacrylamide (BioRad)可以代替双丙烯酰胺。

(4) 这个溶液将有助于样品沉到孔底部。染料可以监测电泳的进程。

参考文献

Hansen, J.N., *Anal. Biochem.* 116:146, 1981.

(沈倍奋译　姚志建校)

第 10 章　DNA 的纯化

10-1　DNA 的精胺纯化法

提要

本法叙述了一个快速、可重复的从低盐水溶性缓冲液(即 TE 或 TBE)中沉淀 DNA 的方法。在 DNA 浓度低时(0.1μg/ml)很好用,并能用于将 DNA 从各种杂质，如游离的核苷酸和蛋白质中分离出来。为了达到最适回收,被沉淀的 DNA 片段必须超过 100bp。精胺结合到 DNA 上并压缩它的结构,使之在溶液中发生沉淀。必要时,在本法中的最后面一步叙述了如何除去与 DNA 结合的精胺。

实验所需时间

1—2 小时

试剂

精胺,100mmol/L 原液(Sigma)

HS 缓冲液

　含 **0.5mol/L NaCl 的 TE 缓冲液**

抽提缓冲液

　75%乙醇

　0.3mol/L 醋酸钠

　10mmol/L 醋酸镁

方法

实验准备

被纯化的 DNA 应以 0.1—100 μg/ml 的浓度存在于低盐或无盐溶液中（盐浓度必须低于或等于 0.1mol/L)。Mg^{2+} 超过 10mmol/L 或 EDTA 超过 1mmol/L，精胺沉淀被抑制。再加入精胺可以克服这种抑制(见下文)。

精胺处理

1. 在 DNA 样品中加入精胺原液,并根据缓冲液中盐浓度使之达到所需的最终浓度。

DNA 缓冲液	最终精胺浓度 (mmol/L)[注释(1)]
低盐缓冲液(例如，TE)	0.1
0.1mol/L KCl	2.0
0.01mol/L KCl,含 6mmol/L $MgCl_2$或 10mmol/L EDTA	1.0
0.1mol/L KCl,含 10mmol/L $MgCl_2$或 15mmol/L EDTA	10.0

2. 冰浴至少 15 分钟。

3. 在微量离心机中，4℃ 离心 10 分钟或在冷冻离心机中 4℃ 12 000 × g 离心 15 分钟。

4. 弃去上清液[注释(2)]。

5. 对于大规模 DNA 制备来说(超过 10 μg DNA；进入步骤 6)沉淀溶于 500 μl HS 缓冲液，对于小规模制备来说溶于 25 μl 抽提缓冲液(进入步骤 7)。

精胺抽提(2 种方法)

6. 大规模抽提：将溶解的沉淀放入透析袋中[注释(3)]。对 100 倍体积的 HS 缓冲液透析24 小时(换液 2 次)。将 DNA 样品(从袋中)稀释到所希望的贮存缓冲液中，或用乙醇沉淀 DNA(20-1)。

7. 小规模制备：用抽提缓冲液溶解沉淀。冰浴 1 小时。冰浴期间振摇 2 次。4℃ 微量离心机离心 10 分钟。弃去上清液，沉淀溶于所需缓冲液。

注释

(1) 用最有效的沉淀DNA的精胺浓度。对于在 TE 缓冲液中的 DNA 样品，我们推荐用 0.1mmol/L 精胺。

(2) 如果需要，在这一步用 80% 乙醇洗沉淀。

(3) 透析袋的准备见 9-3。

参考文献

Gosule, L.C., and Schellman, J. A., *J. Mol.Biol.* **121**:311, 1978.
Hoopes, B.C., and McClure, W.R., *Nucleic Acids Res.* **9**:5493, 1981.
Widom, J., and Baldwin, R.L., *J. Mol. Biol.* **144**:431, 1980.

10-2 DNA 的玻璃粉洗脱法

提要

这是电洗脱以外的另一种从琼脂糖凝胶片上纯化 DNA 片段的方法。凝胶溶解在 NaI 中，DNA 特异性地结合到玻璃粉上。洗涤结合的 DNA 以除去杂质，然后以低盐缓冲液从玻璃上洗脱下来。本法不适用于硼酸缓冲液制备的琼脂糖凝胶或丙烯酰胺凝胶(凝胶片不溶解)。这种方法同样可用于纯化在溶液中的 DNA，例如用于顺序分析的 M13 DNA 制备物(16-7)。

实验所需时间

溶液制备后 4—5 小时

试剂

预先洗涤 325 目粉状燧石玻璃[注释(1)]。

TE 缓冲液

碘化钠溶液

90.8g 碘化钠

1.5g 亚硫酸钠

用水调到 100ml

经 Whatman 1 号滤纸或 0.45μm 滤膜过滤，加 0.5g 亚硫酸钠到饱和。避光(盖锡箔)4℃保存

乙醇洗脱液

50ml 乙醇，内含：

20mmol/L Tris, pH7.4

1mmol/L EDTA

0.1mol/L NaCl

−20℃保存

3mol/L 醋酸钠，pH7.4

乙醇

方法

实验准备

切胶前先照相。用新的保安刀片从琼脂糖凝胶上切下所需条带(用放射性物质或溴乙锭显示)。整个操作均须戴手套。

从胶上洗脱

1. 将含所需 DNA 片段的琼脂糖胶放在碘化钠溶液中，2ml/g 胶。溶液在 37℃保温 1 小时，避光保存[注释(2)]。
2. 将玻璃粉用水稀释成 50% 浆(v/v)。
3. 当所有的琼脂糖完全溶解时，振摇玻璃浆直至所有的粉状物悬浮。对每微克DNA加 3μl 浆到溶解的凝胶液中。冰浴至少 90 分钟[注释(3)]。
4. 在微量离心机中离心 1 分钟。弃去上清液。4℃用 500μl 碘化钠溶液洗沉淀。微量离心机离心 1 分钟，弃去上清液。
5. 4℃加 500μl 乙醇洗涤液。离心 1 分钟，弃去上清液。乙醇重复洗 2 次。

从玻璃粉洗脱

6. 加 25μl TE 缓冲液到玻璃沉淀中。37℃保温 30 分钟。
7. 置微量离心机离心 1 分钟。液体转移到新的离心管。现在可直接使用样品(下接步骤 10)或乙醇沉淀(下接步骤 8)。

样品抽提

8. 加 3μl 3mol/L 醋酸钠，混合。加 75μl 乙醇。干冰中冻 10 分钟。
9. 4℃离心 10 分钟。弃去上清液。沉淀溶解在TE缓冲液中。
10. 用 O. D.测量法(20-3)，或在胶上比较溴乙锭染色(9-3 步骤10)测 DNA 含量。

11. −20℃贮存样品。

注释

(1) 玻璃粉有商品出售(IBI),也可从其它供应者那里得到。实验室同样能制备。但这是一个危险的操作,故要非常小心地进行。详细见参考文献。

步骤:在500ml玻璃烧杯中悬浮250ml 325目的粉状玻璃(Eagle Ceramics)于200ml水中。搅拌1小时,让杯子放1小时使大粒下沉,上清液转到50ml管子中,5 000×g离心10分钟。在玻璃烧杯中,用150ml水中重新悬浮沉淀。加1/2体积浓硝酸。在通风橱中加热至接近沸腾。**必须非常小心**,避免碰到皮肤和衣服。让混合物冷却。5 000×g离心10分钟,收集酸处理的玻璃粉。用水洗涤直至混合物pH为7.0(用pH试纸试,大约换4次水)。在水中以50%的浆保存。

(2)在硼酸缓冲液,如TBE缓冲液中走的胶不能用,因为胶片不完全溶解。

(3) 对于每一种玻璃制品来说,结合一定量DNA所需的玻璃浆的确切量可能需要调节。用过量的玻璃并不好。

参考文献

Vogelstein, B., and Gillespie, D., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 76:615, 1979.

10-3 提纯DNA的其它方法

提要

本法用2个商品层析柱从杂质中纯化DNA。所叙述的Nensorb (Du Pont/NEN)和Elutip (Schleicher 和 Schuell)都很好用。制备得不好的DNA片段通常能通过这些纯化步骤得以改善。此外,用这些技术可将放射性标记的三磷酸盐从较大的DNA片段或寡核苷酸中除去。

实验所需时间

30分钟

试剂

用于Nensorb

Nensorb柱(Du Pont/NEN)

HPLC规格的无水甲醇

洗涤液A

0.1mol/L Tris, pH7.4

如果用的样品不是合成的寡核苷酸则加10mmol/L三乙胺和1mmol/L EDTA

洗脱液B

20%乙醇水溶液[注释(1)]

2个注射器(6ml)

用于 Elutip

Elutip 柱 (Schleicher 和 Schuell)
2 个注射器(6ml)
0.45μm 醋酸纤维滤膜, Elutip 预滤器 (Schleicher 和 Schuell NA010/27)
低盐缓冲液
 0.2mol/L NaCl
 20mmol/L Tris, pH7.4
 1mmol/L EDTA
高盐缓冲液
 1mol/L NaCl
 20mmol/L Tris, pH7.4
 1mmol/L EDTA
TE 缓冲液
乙醇

方法

实验准备

准备好待纯化的 DNA 样品。

Nensorb 方法

1. 按包装内的说明装柱。
2. 用 6ml 无水甲醇洗柱,以注射器轻轻加压[注释(2)]。然后用 6ml 溶液 A 洗涤。
3. 样品在 0.5ml 溶液 A 中加到柱上[注释(3)]。另外用 1.5ml 溶液 A 洗柱。
4. 用 0.5ml 溶液 B 洗脱 DNA,收集柱上流出的第一个 0.5ml(大约 11 滴)。所有 DNA 应在这一部分[注释(4)]。
5. 真空离心干燥样品。
6. 悬浮在所选择的缓冲液中。弃去 Nensorb 柱。

Elutip 方法

进行实验前,欲纯化的 DNA 必须置于低盐缓冲液中(例如低于 0.2mol/LNaCl)。样品范围 10ng—100μg,片段长度小于 5kb。

1. 在6ml 注射器中装 3ml 高盐缓冲液,将柱子接到注射器末端,轻轻加压使缓冲液流过柱子。不要回抽活塞,否则将使装填的树脂断裂。
2. 在第二个注射器中吸入 5ml 低盐缓冲液,接到柱子上,如上所述使缓冲液通过柱。
3. DNA 样品吸入低盐注射器。注射器上附着 0.45μm 醋酸纤维膜,将柱子装到膜的另一端,样品慢慢滴入膜和柱子[注释(5)]。
4. 拔下注射器装入 3ml 低盐缓冲液,再放上膜,接到柱上,用此溶液洗膜。

5. 在注射器中放入 400 μl 高盐缓冲液。直接接到柱上(即不加滤膜),慢慢压入柱内,在 1.5ml 微量离心管中收集洗脱的 DNA。

6. 加 1ml 乙醇沉淀 DNA (如果 DNA 浓度很低,用酵母 tRNA 作载体)。在干冰中冻 10 分钟,4℃ 微量离心机上离心 10 分钟。

7. 在所选择的缓冲液中悬浮 DNA 沉淀[注释(6)]。

注释

(1) 可用于从柱上洗脱样品的其它溶剂: 70% 正丁醇或 50% 甲醇。注意: 用正丁醇抽提的样品不得留下微量溶剂。

(2) 加压于注射器可能引起样品损失,每步操作间不要让树脂变干。

(3) 对于 Nensorb-20 柱,推荐的 DNA 最大量为 20 μg。

(4) Nensorb 柱纯化 DNA 很快,而且不留下任何盐。使用后弃去柱。

(5) 注射器加压可能引起样品损失。

(6) 能用水、TE 缓冲液、TBE 缓冲液等。

(沈倍奋译 姚志建校)

第 11 章　真核细胞 RNA 的制备和分析

11-1　异硫氰酸胍法制备总 RNA

提要

即使在内源性 RNA 酶水平高的情况下，本法也是一个通用和有效的、从大部分组织和培养细胞中抽提完整 RNA 的方法。用组织匀浆器(Polytron)使细胞在异硫氰酸胍中裂解。裂解液铺到 CsCl 梯度液上，在超离心机中离心。蛋白质留在水溶性胍基部分，DNA 区带在 CsCl 中，RNA 沉淀在管底(橡胶状物的沉淀)。重新溶解沉淀回收 RNA。如果梯度的容量未超载，RNA 的回收一般是好的。本法能用于从组织中分离 RNA(下列步骤 1—13)，或从细胞中分离 RNA 和 DNA (步骤 14 开始)。

实验所需时间

第 1 天：制备组织并开始梯度离心，1 小时

第 2 天：纯化 RNA，3 小时

特殊装置

超离心机和有相应离心管的转头 (Beckman SW41，和 SW55 或 Du Pont/Sorvall TH641 和 TH655) Polytron 或其它类型的组织匀浆器

试剂

0.3mol/L 醋酸钠，pH6(高压灭菌)

3mol/L 醋酸钠，pH6

tRNA 10mg/ml

GIT 缓冲液(配制 200ml)

- 94.53g 异硫氰酸胍(GIT)(最终浓度 4mol/L)
- 1.67ml3mol/L 醋酸钠，pH6
- 体积补到 200ml
- 过滤灭菌(0.22μm 滤膜)
- 加1.67ml β-巯基乙醇(在通风橱中加)

CsCl 缓冲液(配制 100ml)

- 95.97g CsCl(最终浓度 5.7mol/L)
- 0.83ml 3mol/L 醋酸钠，pH6
- 体积加到 100ml
- 过滤灭菌(0.22μm 滤膜)

无水乙醇和80%乙醇

蛋白水解酶K(BM)

PK缓冲液

150mmol/L NaCl

10mmol/L Tris, pH7.4

10mmol/L EDTA

0.4% SDS

SS-苯酚

氯仿

方法

培养细胞

1. 约 5×10^7 细胞置于10ml有盖聚丙烯管中[注释(1),(2)]。离心除去培养液,每克细胞沉淀悬浮在4ml GIT缓冲液中(步骤4)。

小鼠脏器

2. 处死小鼠。如果需要的话,用水冲掉血液。用酒精擦腹部,打开腹腔,取出所要的脏器。下面列出的是一些组织的例子,它们都易于解剖和使用。每个组织要吸去血,分别直接放入管中以进行步骤3的操作或置于液氮中备用[注释(3)]。每个器官分别加到10ml有盖聚丙烯管中[注释(4)]。

较大的器官(每个用0.5—1.0g)	小器官(每个用0.25—0.5g)
a. 脾	g. 胰腺
b. 肾	h. 睾丸
c. 腹腔平滑肌	i. 骨骼肌
d. 肝	j. 胸腺
e. 唾液腺	k. 心脏
f. 脑	l. 肺

3. 加入冰冷的GIT缓冲液:a—f每管加4ml;g—l每管加2ml。

4. 每管在冰浴里的Polytron中以中等速度匀浆15秒(这一步是恒定的)。样品与样品间要用大体积水仔细洗Polytron(例如以1L的瓶洗2次),然后用GIT缓冲液淋洗(在15ml有盖管中)[注释(5)],以避免样品的交叉污染。如果不能马上离心,这一步样品可以保存在 −70℃。

5. 在超离心管中加:

a. 对样品a—f或培养的细胞;在约10ml的管中加4ml CsCl缓冲液;然后在顶上小心地铺上胍裂解的样品(例如Beckman SW41 或 Sorvall TH641)

b. 对样品g—l:在约5ml管中加入1.7ml CsCl缓冲液;顶上铺胍裂解的样品(例如Beckman SW55 或 Sorvall TH655)

6. 将GIT缓冲液加到每个管子的顶部以防止离心过程中离心管的破裂。SW55转子

35 000rpm(179 000 × g)或SW41 转头 32 000rpm(174 000×g),20℃离心过夜(21 小时)。为了使得量恒定,离心时间要一致,并且离心温度不低于 20℃,否则 CsCl 在梯度中可能沉淀。

7. 抽吸掉大部分上清液[注释(6)],用吸管吸出最后 200—400μl。不得使吸管尖碰到管底。沿管壁拭抹除去残留的缓冲液,不得搅乱沉淀。底部澄清的胶状的沉淀是 RNA 样品[注释(7)]。

8. 在 200μl 0.3mol/L 醋酸钠 pH6 中通过振荡或反复抽吸悬浮沉淀。转到 1.5ml 微量离心管中。另外用 100μl0.3mmol/L 醋酸钠淋洗管子并加到微量离心管中。

9. 进行步骤 10,除非 RNA 制品在这一步被污染(即成团或变色)。样品可进一步纯化:加 SS-苯酚和氯仿各 300μl。振荡混合。在微量离心机中离心 1 分钟使相分离。取出上层水相加到新管中。

10. 加 750μl 乙醇。干冰中冻存 10 分钟。

11. 微量离心机中离心 10 分钟。弃去上清液。加 300μl 80% 乙醇,混合。4℃ 微量离心机上离心 2 分钟,弃去上清。真空离心干燥沉淀。对 a—f 管每份沉淀悬浮在 200μl 水中,对 g—l 管悬浮在 100μl 水中[注释(8)]。

12. 通过 260nm 测 O. D. 定 RNA 的量(20-3)。

13. 样品贮存在 −70℃,至少可稳定几个月[注释(9)]。

DNA 和 RNA 回收

14. 约 5×10^7 培养细胞悬浮在培养液中,置聚丙烯管中[注释(10)]。800 × g 离心 5 分钟,弃去上清液,通过摇动或振荡将细胞悬浮在 4—8mlGIT 缓冲液中。GIT 缓冲液将溶解细胞,释放核酸并增加溶液的粘度。

15. 将在 GIT 缓冲液中溶介的细胞放到在 Beckman SW41 或 Sorvall TH641 管中的 4ml CsCl 缓冲液上。用 GIT 缓冲液将管子充满。

16. 20℃ 32 000 rpm(174 000 × g)离心过夜。

17. 小心除去管子上部 2/3 的 GIT 溶液。用大孔吸管在管子下部 1/3(4ml)含 DNA 的地方除去 CsCl 缓冲液,不要扰乱管底的 RNA 沉淀。粘度增加显示了 CsCl 溶液中 DNA 的存在。管底澄清的胶状沉淀是总 RNA。按步骤 8—13 处理 RNA 沉淀。

18. 将含 DNA 的 CsCl 溶液放入 50ml 聚丙烯管中,加 11ml 水,加 30ml 乙醇以沉淀DNA。轻轻倒置混匀。在室温中 DNA 应该立即沉淀,粘性的白色 DNA 沉淀可以缠在吸管尖上被回收,并将它转到新的 50ml 聚丙烯管中。

19. 用 10ml 80% 乙醇洗 DNA 沉淀。通过缠绕或在室温 3 000 × g 离心回收 DNA 沉淀。弃去上清液。空气干燥 DNA 沉淀,但不要完全干。

20. 在 10ml PK 缓冲液中重新悬浮 DNA 沉淀。如果沉淀多,这一步可能需要在 37℃ 轻轻振摇几小时。

21. 加 10mg 蛋白酶 K,65℃ 保温 15 分钟。

22. 37℃ 轻轻摇过夜。

23. 加 5ml 氯仿和 5ml SS-苯酚。轻轻倒置混合,在 30ml 酸洗过的 Corex 管中 12 000 × g 离心 10 分钟使二相分离。

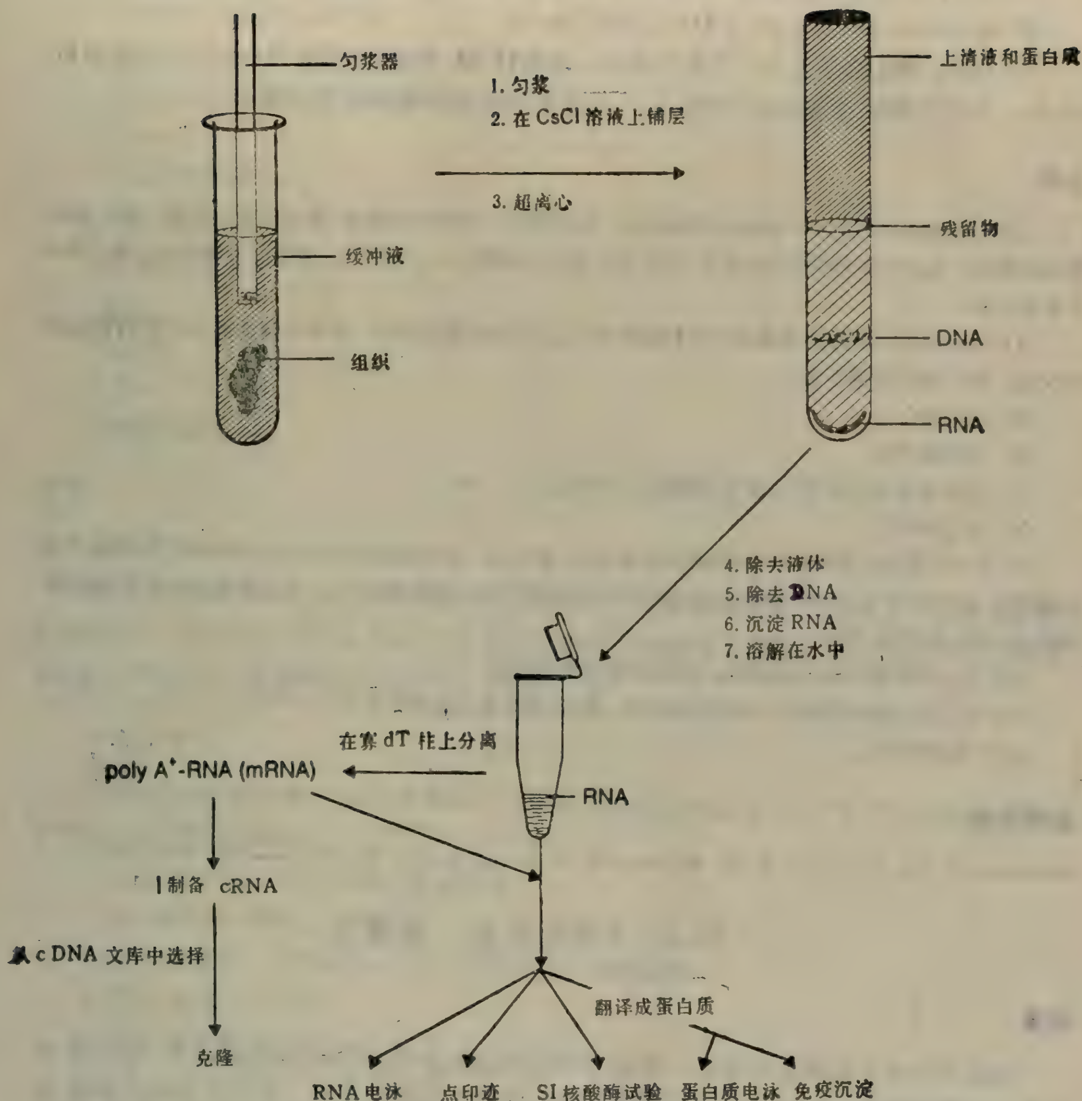


图 11.1 RNA 的制备。组织置异硫氰酸胍(GIT)中匀浆，匀浆液在 CsCl 梯度离心分离。纯化后，得到的 RNA 有多种用途，如图所示。

24. 取上层水相加到新管中，重复步骤 23。

25. 取上层水相到新管，加 10ml 氯仿。轻轻倒置混合，在一个酸洗过的 Cortex 管中 12 000 × g 离心 10 分钟使二相分离。

26. 取上层水相加到一个清洁的酸洗过的 30ml Corex 管中，加 1ml 3mol/L 醋酸钠，加 20ml 乙醇。冰浴 20 分钟使 DNA 沉淀形成。

27. 4℃ 12 000 × g 离心 10 分钟回收 DNA 沉淀，弃去上清液。

28. 用 5ml 80% 乙醇洗沉淀。

29. 按步骤 27 回收 DNA 沉淀。

30. 从沉淀中蒸发掉乙醇，但不要完全干燥。

31. DNA 沉淀重新悬浮在 TE 缓冲液中。大量 DNA 可能需要几小时才完全溶解。

32. 在 260nm 处测 O. D. 定 DNA 浓度(20-3)。

33. DNA 可以贮存在 4℃ 无菌容器中，准备作 RE 消化(5-4)和 Southern 印迹分析(5-6)。为了长期贮存基因组 DNA，加入几滴氯仿抑制细菌和真菌污染。

注释

(1) 小鼠组织或大约 10^8 细胞沉淀都能用。也能用另一些物种的器官，但组织大小保持一致，如所指出的那样。每根 11ml 的管子组织在 1g 以下，或 5ml 的管子 0.5g 以下，否则由于梯度的过载 RNA 产量将下降。

(2) 尽可能用一次性的消毒的塑料物品和高压过的溶液避免污染。对离心管和另一些玻璃物品高压灭菌。整个操作要戴手套。

(3) 见注释(1)。

(4) 见注释(2)。

(5) 最好接着进行步骤 5，但样品能在这一步冻存于 −70℃。

(6) 见注释(2)。

(7) RNA 沉淀可能是看不见的或澄清的，但总是有的。如果沉淀是大的白色的颗粒，可能由于离心温度低于 14℃ 而使 CsCl 沉淀出来，或由于离心速度过高，这是危险的。试试在乙醇中反复沉淀或可除去 CsCl 和回收 RNA。

(8) 这一步要保证水是双蒸的、高压灭菌的和高纯的。

(9) 为了安全地长期贮存，再用乙醇沉淀、离心、沉淀在乙醇中贮存于 −70℃。

(10) 见注释(2)。

参考文献

Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E., MacDonald, R. J., and Rutter, W., *Biochem.* 18: 5294, 1979.

11-2 RNA 制备：微量法

提要

这是另一种从各种组织样品中制备 RNA 的方法，它较原来的方法耗时少，另一个优点是不需要超离心。用这个方法得到的 RNA 适用于点印迹分析，用于对分离的样品进行快速筛选。这种RNA同样能用于 RNA 印迹分析，但异硫氰酸胍法(11-1)所得的 RNA 质量较好。

特殊装置

Polytron 组织匀浆器或相应的用具

实验所需时间

2 小时

试剂

匀浆缓冲液

100ml 3mol/L 醋酸钠，pH6

20μl 0.5mol/L EDTA

20μl Vanadyl 核苷复合物（BRL）

100μl 肝素溶液（10mg/ml）

580μl 水

总体积是 820μl

10% SDS

SS-苯酚

氯仿

异戊醇

乙醇

TE缓冲液

方法

实验准备

制备待分离 RNA 的组织[注释(1)]。制备 RNA 要戴手套并用高压灭菌、酸洗过的玻璃器皿。对纯化的 RNA 用高压灭菌的微量离心管和微量吸头。高压灭菌所有的缓冲液(如：TE)，用于溶解纯化后的 RNA (步骤 13)。

操作步骤

1. 将 100mg 新鲜组织加到有 820μl 匀浆缓冲液的无菌试管中。用 Polytron 以中等速度匀浆 15 秒[注释(2)]。
2. 立即加 100μl 10% SDS。振荡混合。
3. 加 1ml SS-苯酚。振荡混合。
4. 加 1ml 氯仿：异戊醇(24:1)[注释(3)]。振荡混合。
5. 55℃ 保温 5 分钟。
6. 冰浴放置 5 分钟。
7. 5 000 × g 离心 2 分钟使分相。
8. 取上层水相到新管中，加 1ml SS-苯酚和 1ml 氯仿：异戊醇(24:1)混合液。振荡混合。
9. 5 000 × g 离心 2 分钟使分相。
10. 水相以等体积转移到 2 个灭菌微量离心管中，加 2.5 体积无水乙醇到水相中，混匀。干冰中放置 10 分钟。
11. 4℃ 微量离心机中离心 10 分钟。
12. 弃去上清液。
13. 沉淀分别悬浮在 25μl 灭菌水中，样品合并在新的微量离心管中。
14. 通过测 O. D. 检查 RNA 浓度(20-3)。
15. －70℃ 贮存。RNA 稳定 3—4 周。
16. 样品现在能用于点印迹步骤(11-5)。

注释

(1) 任何组织都能用;在这一步中每管用 100mg 组织或 10^7 细胞。预先吸去血液和除掉结缔组织。

(2) 每次使用前和使用后用大量水洗组织匀浆器避免交叉污染。当制备样品时戴手套避免污染。

(3) 在通风橱中用异戊醇。异戊醇用来减低相间的界面。

参考文献

Lizardi, P. M., *Meth. Enzymol.* **96**: 24, 1983.

Scherrer, K:, and Darnell, J., *Biochem. Biophys. Res Commun.* **7**: 486, 1962.

11-3 在寡(dT)纤维素上选择分离多聚(A^+)RNA

提要

本法从非多聚腺苷酸化的 RNA(rRNA 和 tRNA)中纯化多聚腺苷酸化的RNA(大部分真核 mRNA)。因为在真核细胞中 mRNA 代表的只是总 RNA 中的一小部分(百分之几),这一步有明显的纯化作用。本法是根据 mRNA 3′末端多聚(A^+)残基与连接到纤维素柱上去的寡(dT)残基间配对的原理。非多聚(A^+)片断不能结合上去并很容易从柱上洗下来,而结合上去的多聚(A^+) RNA 要通过降低柱上缓冲液的盐浓度而被洗脱下来。在RNA胶印迹试验和S1核酸酶保护实验中,多聚(A^+) RNA 较总 RNA 得出更好的信息(17-1)。它也是 cDNA 文库构建的起始物(14-2)。

实验所需时间

2 小时

特殊装置

分光光度计

试剂

寡(dT)纤维素(例如: Collaborative Research 3型或 P-L7 型)

0.1mol/L NaOH 含 5mmol/L EDTA

95% 和 70% 乙醇

3mol/L 醋酸钠,pH6,高压灭菌

溴乙锭,10mg/ml

加样缓冲液 A

40mmol/L Tris, pH7.4

1mol/L NaCl

1mmol/L EDTA

混合并高压灭菌[注释(1)],加 SDS 到 0.1%

加样缓冲液 B

20mmol/L Tris, pH7.4

0.1mol/L NaCl

1mmol/L EDTA

混合并高压灭菌[注释(2)],加 SDS 到 0.1%

洗脱缓冲液

10mmol/L Tris, pH7.4

1mmol/L EDTA

混合并高压灭菌[注释(3)],加 SDS 到 0.05%

方法

实验准备

制备柱子：将悬浮在加样缓冲液 B 中的约 0.5ml 寡(dT)纤维素糊倾入一个灭菌的一次性塑料柱或塞玻璃棉的巴斯德吸管中(高压灭菌)。最终的典型柱体积为 0.25—0.5ml。用 3ml含 5mmol/L EDTA 的 0.1mol/L NaOH 洗涤。然后用水洗柱子直到流出液的 pH 小于8 (用 pH 试纸测)。用 5ml 加样缓冲液 A 洗柱并平衡。

制备 EB-琼脂板：加 0.4g 琼脂到 40ml TE 中。煮沸 1 分钟,冷到 60℃ 左右。加 4μl 溴乙锭原液(10mg/ml)。倾入培养皿,室温凝固。

制备样品

1. 将 RNA 样品(1—10mg)溶解在 500μl 水中。加热到 65℃,5 分钟。加 500μl 预先加热到 65℃ 的加样缓冲液。混合。冷却到室温,放 2 分钟。

2. 将 1ml 样品加到柱上。收集流出液。加热流出液到 65℃，5 分钟。冷却到室温，2 分钟。

3. 流出液重新加到柱上。用 5ml 加样缓冲液 B 洗柱[注释(4)]。流出液含非聚合(A$^+$) RNA,可弃去。

4. 加 1.5ml 洗脱缓冲液，10 滴为一管收集。

5. 用溴乙锭琼脂平板试验鉴定含 RNA 的部分：点 2μl 样品到预先制备的溴乙锭琼脂板上。等 20 分钟,用短波长的 UV 灯照。与只有缓冲液的对照相比，所有阳性样品显示红色荧光。同时点系列稀释的 RNA 标准以估计样品中 RNA 浓度。

纯化和浓缩

6. 合并所有阳性的多聚(A$^+$) RNA 部分。加 1/10 体积 3 mol/L 醋酸钠(pH6)。加 2.5 体积乙醇。

7. 干冰中冻 30 分钟。

8. 4℃ 微量离心机离心 5 分钟。

9. 弃去上清液,用 500μl 80% 乙醇洗沉淀。

10. 4℃ 微量离心机中离心 3 分钟,除去上清液。

11. 真空干燥沉淀。

12. 重新悬浮在经过高压灭菌的水中,约 1μg/μl。

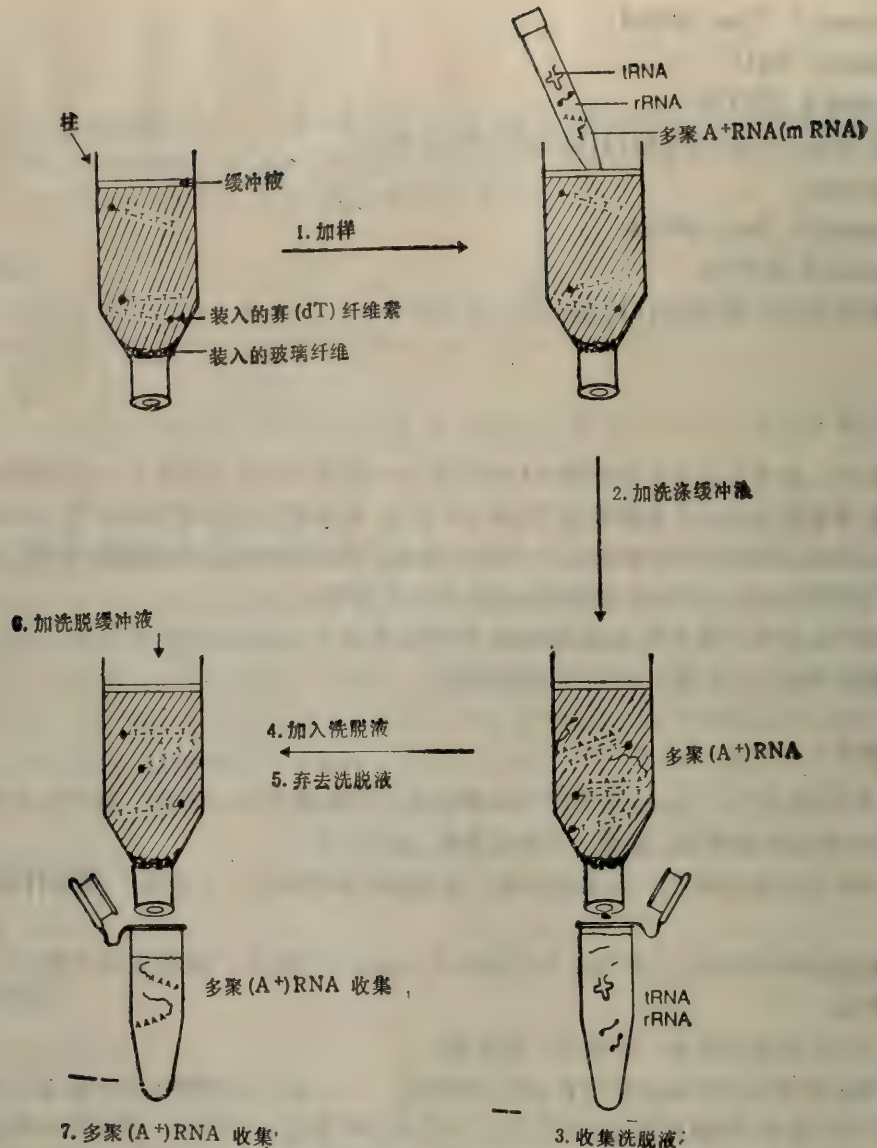


图 11.2 寡(dT)分离多聚(A^+)RNA。样品加到将寡(dT)共价结合到惰性支持物(如纤维素)的柱上。仅带有多聚(A)尾部的 RNA 与柱上的寡(dT)杂交,而 rRNA 和 tRNA 则从柱流出。多聚(A^+) RNA (可设想为 mRNA)随后洗脱。

13. 2—4μl 样品走 1.0% 甲醛-琼脂胶(11-4)以检查制备物的量[注释(5)]。

14. −70℃ 贮存多聚(A^+)RNA,直至使用。

注释

(1) 高压所有溶液、玻璃柱、水等(除 SDS 外)以灭活 RNA 酶。整个操作须戴手套,因为从皮肤来的污染特别是 RNA 酶可能引起一些问题。

(2) 见注释(1)。

(3) 见注释(1)。

(4) 如果需要非聚(A^+) RNA 能从最初的加样缓冲液流出物中回收。

(5) 一次通过柱子可除去大部分 rRNA 和 tRNA 污染物；两次过柱一般得到 95% 以上多聚(A^+) mRNA。所期望的聚 (A^+) RNA 得量应是总 RNA 的百分之几。

参考文献

Aviv, H., and Leder, P., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **69**: 1408, 1972.

11-4 分离 RNA 的甲醛凝胶电泳和 Northern 印迹法

提要

甲醛-琼脂胶是一种简单的变性电泳系统，它能按大小分离和分辨单链 RNA。 然后可将 RNA 从凝胶上转到 NC 上，并与感兴趣的放射性标记探针杂交。

实验所需时间

第一天：5 小时走胶并开始印迹

第二天：3 小时烤转印后的 NC 膜并开始杂交

第三天：2 小时洗涤并开始自显影

特殊装置

水平凝胶电泳装置

通风橱

试剂

1% SDS

琼脂糖(Biorad 或 Seakem)

10 × MOPS 缓冲液

  0.2mol/L MOPS (3[N-吗啉]丙磺酸)

  0.05mol/L 醋酸钠

  0.01mol/L EDTA

37% 甲醛溶液 (Mallinckrodt)

溴乙锭，10mg/ml

加样缓冲液(每 1—2 周配 1ml 新鲜的；当颜色改变时就丢弃，或配制 10ml 以 0.5ml 为一管贮存于 −20℃)

  0.72ml 甲酰胺

  0.16ml 10 × MOPS 缓冲液

  0.26ml 甲醛(37%)

  0.18ml 水

0.1ml 80% 甘油

0.08ml 溴酚蓝(饱和溶液)

10 × SSC 缓冲液

方法

实验准备

用水、1% SDS 或洗涤用去垢剂洗净胶垫和所有盒子、梳子等。用水淋洗。所有的东西均无 RNA 酶沾染是非常重要的。如果同一实验室中也用 RNA 酶，本方法需单用一套设备。整个操作过程戴手套。

胶的制备

1. 将下列试剂加在一起:
   3g 琼脂(对 1% 的胶)[注释(1)]
   30ml 10 × MOPS 缓冲液
   255ml H_2O
2. 用微波炉或放在沸水浴中 5 分钟,溶解和灭菌琼脂胶混合物。
3. 冷到 50℃。在通风橱中加 16.2ml 37% 甲醛溶液[注释(2)]。旋转混合。
4. 加 20μl 溴乙锭,旋转混合。
5. 混合物在通风橱中放 15 分钟以冷却和减少甲醛的蒸气。
6. 放好梳子并将琼脂溶液注在平板上制胶[注释(3)]。如用商品成胶模则更方便，它有加样孔成形模的部位。

电泳

7. 取 10—15μg 总 RNA样品[或 1—2μg多聚(A^+)RNA]并将样品真空干燥[注释(4)]每个干燥样品加 20μl 加样缓冲液。95℃ 加热 2 分钟使 RNA 变性。
8. 每孔加 20μl RNA 样品。标准加入另一孔中[注释(5)]。
9. 200V 走约 2—3 小时,直至溴酚蓝移到胶的 3/4 处。转印前在紫外灯上将胶与标尺一起照相以记录标准的位置。总的真核细胞 RNA 含有 2 个丰富的成分——28SrRNA (约 5kb)和 18S rRNA(约 2kb),它们能用作分子量标准。

胶的转印[注释(6)]

10. 500ml 10 × SSC 洗胶 2 次,每次 20 分钟,从胶上除去甲醛。
11. 将 500ml 10 × SSC 注入槽内，在 10 × SSC 缓冲液中浸湿 1 片 Whatman 3MM 滤纸(大约 23 × 50cm)。
12. 在槽上放一块 20 × 30cm 玻璃板。将浸湿的滤纸放在板上，两端悬人缓冲液中作为“桥”。赶掉滤纸上的任何气泡[注释(7)]。
13. 小心地将胶倒置于滤纸条上(即加样孔开口端朝下)。其做法是将第二块板放在胶上,并小心地将 2 块板及夹住的胶一起翻转。移去现在翻在上面的板,并让凝胶由现在的底板上滑到滤纸条上。

14. 在水中浸湿 NC 滤膜，铺平在胶上。

15. 在水中浸湿 2 片 Whatman 3MM 滤纸，分别平放在 NC 滤膜的上部。

16. 在 3MM 纸上放 6 层纸巾[注释(8)]。

17. 在 6 层纸巾上放 4 层折叠的吸水纸，每层 2—3cm 厚。

18. 盖一块 20 × 20cm 的玻璃板。上面放一个小的重物。

19. 室温至少放 12 小时，通过毛细作用转到 NC 膜上。

第二天

20 去掉折叠的纸巾和纸。沿玻璃板边缘剪去滤纸条的边。 在滤膜和凝胶上轻轻叩打。

21. 取下滤纸条并弃去。在加样孔区域的中间，刺个孔作为电泳原点的标志。在第一加样孔处刺 2 个孔以确定膜的方向。

22. 取下胶并弃去。将 NC 膜放在 2 张 Whatman 3MM 滤纸间。两边压紧，80℃ 真空下干燥 2 小时[注释(9)]。

23. 滤膜现在可以用于杂交。

杂交和放射自显影

24. 如 DNA 杂交中所述(6-3 或 7-2)，滤膜与放射性标记的探针[或缺口翻译 (7-1) 或合成的探针(6-2)]杂交。Northern 印迹和 Southern 印迹杂交法(11-6)在操作上基本没有差别。

25. 洗涤后，滤膜在 X 线片上曝光过夜(20-5)。冲洗，如果需要的话，可以调节曝光时间。

注释

(1) 对于小的 mRNA (即小于 2kb)，用较高浓度的琼脂胶，例如 1.5%(4.5g)。

(2) 最初的步骤中要求用 2.2mol/L 甲醛，这种浓度可能对胶的染色不利。 推荐用 0.66mol/L 可以避免这些问题。

(3) 胶的制备见 5-5。

(4) 如果所需体积在 5μl 以下，则可不干燥样品直接将加样缓冲液加到总体积为 20μl。

(5) 标准可以制备或购买(例如，从真核细胞总 RNA 中得到的 28S 和 18S rRNA，分别为 5.1 和 2.0kb；或从 *E. Coli* rRNA 中得到的 16S 和 23S，分别为 1.6 和 2.9kb)。总 RNA 样品已经含有 28S 和 18S rRNA 可作为内标。

(6) 见 5-6 中的详细叙述。

(7) 用一根 5ml 玻璃移液管滚动，赶掉气泡和过量液体。

(8) 可用打开的单层纸巾(例如：Scott 纸 #175 褐色)。

(9) 放入真空炉前必须将滤膜吸干。

参考文献

Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J., and Boedtker, H., *Biochemisory* 16: 4743, 1977.
Thomas, P., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 77: 5201, 1980.

11-5 标记探针与 DNA 或 RNA 样品的“点印迹”杂交

提要

本法提供了一个较 Northern 或 Southern 印迹分析更快且省时间的测定样品中特异性 RNA 或 DNA 的方法。直接将 RNA 或 DNA 转到 NC 的点上。然后将点了点的滤膜与标记探针杂交。本法同样可用于部分降解的 RNA 样品，具有很好的半定量结果。

实验所需时间

3 小时准备滤膜

特殊装置

点印迹仪(例如 Bio-Rad 或 Schleicher 和 Schuell)
真空源

试剂

20 × SSC 缓冲液
染料：0.25% 溴酚蓝配在 25% Ficoll 中
TE 缓冲液

方法

实验准备

参见 5-1、5-2、5-3、11-1 或 11-2 中所述制备 DNA 或 RNA 样品(1—2μg)。样品应溶在水或 TE 缓冲液中。通过缺口翻译(7-1)或末端标记(6-2)制备 ^{32}P 标记的探针。

用仪器进行印迹分析(图 11.3)

1. 10ml 20 × SSC 与 10ml 水混合。
2. 在上述混合液中浸湿 NC 和 Whatman 3MM 纸各 1 片(每片都切成与仪器同样大小)[注释(1)]。
3. 将 Whatman 3MM 滤纸首先放在仪器上，上面放 NC[注释(2)]。
4. 放上盖并拧紧。接到真空泵上。
5. 每孔用 100μl 20 × SSC 洗。
6. 在一些边缘孔加 2μl 染料作方位标志。
7. RNA 点印迹：在 50μl 20 × SSC 中加 1—2μg RNA，加到孔中。

DNA 点印迹：在 10μl TE 缓冲液中加 1—2μg DNA，95℃ 加热 5 分钟。再加 40μl 20 × SSC，然后一并加到孔中[注释(3)]。

8. 在抽真空的情况下，每孔用 100μl 20 × SSC 洗。
9. 关掉真空泵，取下仪器盖并拿下滤膜。
10. NC 滤膜夹在 2 张新的 Whatman 3MM 纸之间放在真空炉中 80℃ 烤 2 小时。

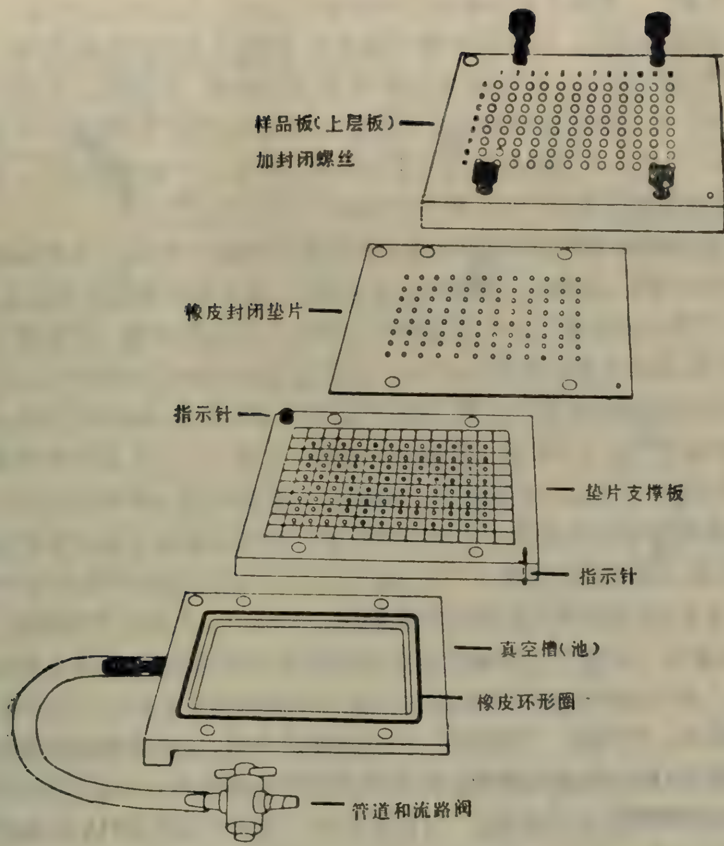


图 11.3 典型的"点印迹"仪示意图。滤膜放在封闭垫片上方,样品加到每个孔中。

11. 按 6-3 或 7-2 所述,将滤膜与放射性探针杂交。

不用仪器进行印迹分析

12. 用 20ml 20 × SSC 和水(1:1)混合液浸湿 NC 滤膜。
13. 用干燥的 Whatman 3MM 滤纸吸干滤膜。
14. 按规定好的行和列,像步骤 7 一样在滤膜上点相同体积溶在 20 × SSC 缓冲液中的 DNA 或 RNA 样品。点一些染料作方位标志。
15. 进行步骤 10 和 11 的操作。

注释

(1) 滤膜边缘必须切割成适合仪器用。
(2) 使用前和使用后必须彻底清洗仪器。
(3) 为了半定量分析,一系列 1:1 稀释的样品加成横行,用于制备浓度曲线。

11-6 探测 RNA 凝胶的一般注意点

提要

完成 Northern 印迹后,能通过杂交确定 RNA 种类,方法类似于 Southern 印迹探

查。常用 2 类探针：克隆化缺口翻译限制性酶切片段和合成的寡核苷酸。杂交条件与 6-3 和 7-2 中描述的相同。细胞中丰富的核糖体 RNA（占总RNA的 80% 以上）有时以非特异性方式与探针结合。因此，当用探针检测 Northern 印迹时必须非常小心，保证胶上接近 18S(2kb) 或 28S(5.1kb) rRNA 区域的 mRNA 杂交信号（阳性区带）不是与 rRNA 的非特异性结合信号。为了减少非特异性结合到 rRNA 上产生的假信号，或为了减少接近 rRNA 区域的阳性区带，下列步骤必须考虑：

1. 对溴乙锭 RNA 胶拍照时，在照相区仔细地沿胶放一把尺。使感兴趣的区带的迁移距离能精细地分辨。同时在每条的顶端打一小孔，便于将来校正迁移距离。

2. 当第一次用一个性质不清的新探针时，要走一个空白对照，即含有从细胞中来的 rRNA 或总 RNA，但没有要研究的 mRNA。这样能估计探针对 rRNA 的亲和力。

3. 在 RNA 制备过程中用一个寡（dT）柱可将 rRNA 从 mRNA 中除去(11-3)。在 RNA 胶上平行地进行总 RNA 和 dT 选择的 RNA 电泳。在 dT 选择的样品中，将减少 rRNA 和探针间的交叉反应。在多聚(A^+)样品中与真核细胞 mRNA 的杂交将增加。

4. 因为双链聚合体的形成是一个动力学反应，结合的寡核苷酸的解离被用来测定区带是否是真的。通过在不同的温度下(25—80℃)用 0.5×SSC洗涤一系列含 RNA 的滤膜，每张都进行自显影，放射性标记的探针将被除去[注释(1)]。如果区带是真的，随着观察熔点温度的“熔点曲线”(温度对区带强度作图得到的曲线)的形状应该是 S 形的。同时，通过这个 S 型曲线，未知 RNA 中不匹配的百分比也可以测出（见 6-3)。探针互补序列的鉴定受很多因素影响，它们是：同源程度、G-C 对的百分数、盐浓度和缓冲液中甲酰胺的百分比。用合成探针，探针长度同样将影响杂交温度和洗涤条件。对缺口翻译的探针，要用 7-2 中的步骤并相应调节洗涤温度。对合成探针，用 6-3 中的 DNA 探测步骤，需要时调节杂交温度和洗涤条件。

注释

(1) NC 超过 80℃ 是不稳定的或不保险的。

参考文献

Suggs, S. V., Wallace, R. B., Hirose, T., Kawashima, E., and Itakura, K., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **78**: 6613, 1982.

11-7 从克隆到质粒内的 DNA 中制备 RNA 探针

提要

近年来已经构建了一些质粒，它们含有在体外对 DNA 依赖性 RNA 聚合酶转录高度特异的启动子顺序。例如 SP6、T3 和T7 启动子。启动子位于多聚衔接克隆繁殖位点附近(类似于 pUC 或 M13)。如果以 3′ 端克隆到这种启动子上去的片段位于多聚衔接区，则 RNA 聚合酶将在体外反应中用纯化的重组质粒作为模板转录克隆的顺序。当转录反应中有标记的核糖-NTP 时，RNA 探针就可合成。可大量制备这些 RNA 探针并用于 RNA 和 DNA 杂交。而且 RNA-RNA 杂交物较 RNA-DNA 杂交物稳定。故能合成高比活性

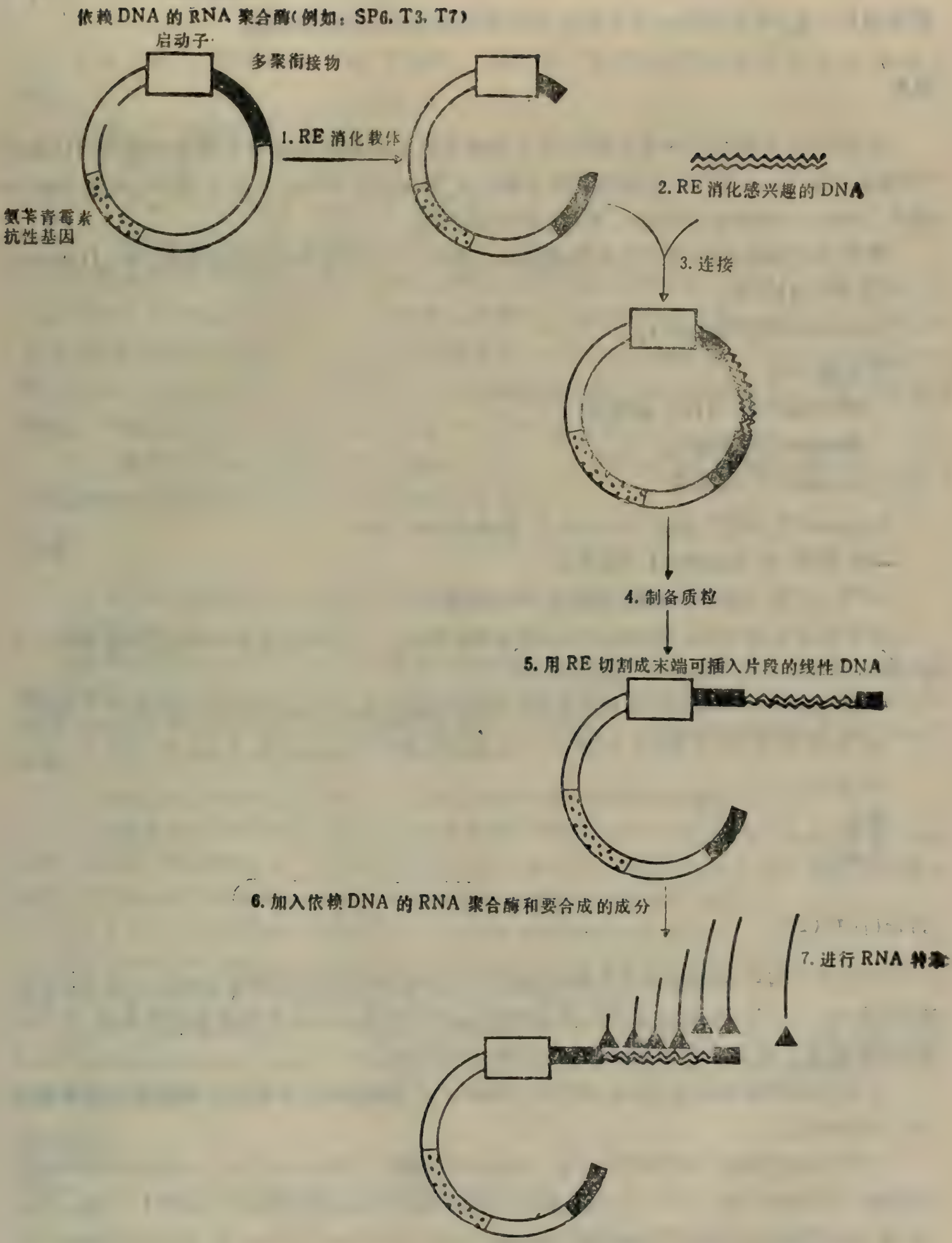


图11.4 具有依赖DNA的RNA聚合酶启动子，例如sp6、T3或T7的质粒转录RNA的图解。有意义的DNA连接到载体上RE切割的末端，载体上存在氨苄青霉素抗性基因以供筛选。随着用RE切割成线性分子，在启动子区域在依赖DNA的RNA聚合酶作用下，RNA开始转录。

的 RNA，作为非常灵敏的探针用于印迹实验。另一个优点是能用体外翻译系统翻译。RNA 探针还有一个优点：它们是单链的，不像双链探针和缺口翻译的 DNA 探针那样容易再缔合。RNA 探针的缺点是易受到到处都有的RNA酶的降解。

试剂

含有DNA依赖性RNA聚合酶启动子和体外转录反应所需的有关物质的载体可以购买（例如从 Du Pont/NEN 可买到 SP6 PAK，从 Promega Biotec 可以买 Riboprobe System 或从 Vector Cloning Systems 得到 Bluescribe)。

所有水应该高压并用二乙基焦碳酸盐(DEPC——一种 RNA 酶抑制剂；50μl/250ml) [注释(1)]处理。

0.1mol/L 醋酸钠，pH5。

反应缓冲液

200mmol/L Tris，pH7.4

30mmol/L $MgCl_2$

20mmol/L 亚精胺

0.4mmol/L DTT 配在 50mmol/L 醋酸钠(pH5)中

2% SDS 含 2mmol/L EDTA

α-^{32}P-UTP，750Ci/mmol（或 α-^{35}S-UTP）

用于启动子的 DNA 依赖性 RNA 聚合酶(例如：从 NEN 或 Promega 来的 SP6，或从 Vector Cloning Systems 来的 T3/T7)

U^0 是 ATP、CTP、GTP 各 10mmol/L 配在 50mmol/L Tris(pH7)中，贮存于 －20℃。

NTP 由 ATP、CTP、GTP、UTP 各 10mmol/L 配在 50mmol/L Tris(pH7)中

SS-苯酚

氯仿

乙醇

方法[注释(2)]

1. 在含 DNA 依赖性 RNA 聚合酶启动子的载体的多聚衔接部位插入一个 DNA 片断[注释(3)，(4)]。例如，在pSP64 或pSP65 中短的(51bp)通用克隆繁殖顺序具有 11 个特异性RE 位点，运用质粒亚克隆的方法(15-1—15-3)。

2. 在适当的细菌宿主(例如 LE392，HB101 或 JM109)中繁殖或扩增质粒以制备模板(8-1 和 8-2)。

3. 用 RE 使重组质粒模板成线状，RE 水解克隆片段插入的 3′ 端，一般在多聚衔接区的远端。用 RE(5-4) 消化 2—3μg 质粒，切在启动子的远端和插入片段的 3′ 末端。消化后，用 SS-苯酚/氯仿抽提质粒，用乙醇沉淀 (20-1)。质粒以 0.2μg/μl 悬浮在水中。

4. 合并下列物质，使总体积为 20μl[注释(5)，(6)]：

4μl 反应缓冲液

0.5μl DTT 溶液

1μl U^0

10μlα-^{32}P-UTP(750Ci/mmol) 或 α-^{35}S-UTP

0.9μg (在 4.5μl 水中) RE 切割的质粒

5. 加 14U DNA 依赖性 RNA 聚合酶。离心使所有液体到管底并在 37℃ 保温 60 分钟。

6. 加入下列物质使反应终止。

20μl 水

25μl 2% SDS，含 2mmol/L EDTA

100μl 0.1mol/L 醋酸钠，pH5

7. 溶液用 SS-苯酚和氯仿各 100μl 抽提，用 500μl 乙醇沉淀 (20-1)。探针悬浮在 1ml DEPC 处理过的水中。如 7-1 步骤 8 中所述，通过 TCA 沉淀 2μl 悬浮的探针来测量 RNA 合成量。合成的 RNA 比活性应该是约 1—2 × 10^9cpm/μg。一个好的转录反应将产生 0.1—1.0μg RNA。因为 RNA 标记的探针是单链，能直接用于杂交反应而不需要变性。不要用碱使 RNA 变性，因为在高 pH RNA 被水解。

8. 乙醇沉淀的部分重新溶解在 100μl 水中。2μl 用于测定比活性[注释(7)]，2μl 走变性的聚丙烯酰胺胶(9-4)以评价产物[注释(8)]。

注释

(1) 整个操作过程戴手套，用无菌的一次性塑料器皿，不要用洗涤过的玻璃物品。

(2) 见注释(1)。

(3) SP6 质粒来自 pUC，具有 SP6 启动子，它插在克隆繁殖部位旁边。现在用与启动子走向相反的通用克隆繁殖位点，在 pSP64 和 pSP65 中进行定向性克隆繁殖是有可能的。当制备一个探针用于与 RNA 印迹中的 mRNA 杂交或 S1 核酸酶保护试验时，必须注意从 SP6 模板转录的探针是 mRNA 的互补链。

(4) 这些质粒具有高的复本数和可供选择的 pBR322 氨苄青霉素抗性基因。

(5) 如果希望非放射性转录 (例如为了蛋白质翻译研究)，可用 NTP 追加液代替 U^0 溶液，并加 1μCi (10μl 100 倍稀释液) α-^{32}P-UTP 以监测反应。保温后 (步骤 6) 加 20μg 无 RNA 酶的 DNA 酶 I，37℃ 10 分钟，然后进行步骤7。RNA转录产物在琼脂糖凝胶上被纯化和分离出来。

(6) 在这一步加入终浓度为 1U/μl 的 RNAsin 抑制外源性 RNA 酶活性。

(7) 从 1μg DNA 模板能合成 10μg 以上 RNA 探针。虽然模板越小达到全长的转录越容易，但长度超过 6kb 的探针能被合成。应得到比活性为 1—2×10^9cpm/μg 探针。

(8) RNA 探针是单链。用于 Northern 印迹杂交，由于它们比活性高且不与第二条链竞争，所以 RNA 探针的灵敏度较缺口翻译的 DNA 探针高 10 倍。不得像缺口翻译中那样用碱使探针变性，稀释杂交缓冲液并直接加到装 NC 滤膜的袋中。

参考文献

Butler, E. T., and Chamberlin, M. J., *J. Biol. Chem.* 257: 5772, 1982.

Green, M. R., Maniatis, T., and Melton, D. A., *Cell* 32: 681, 1983.

Johnson, M. T., and Johnson, B. A., Biotechniques (May): 156,1984.

Kassavetis, G. A., Butler, E. T., Roulland, D., and Chamberlin, M. J., J. Biol. *Chem.* 257: 5779, 1982.

Melton, D. A., Krieg, P. A., Rebasliati, M. R., Maniatis, T., Zinn, K., and Green, M. R., *Nucleic Acid Res.* 12: 7035, 7057, 1985.

(沈倍奋译　姚志建校)

第 12 章　从噬菌体克隆制备 DNA

12-1　噬菌体的生长和制备

提要

本法对多份克隆化噬菌体 DNA 样品的快速定性是有用的，并为以后大规模感染提供噬菌体来源。对每个有意义的克隆，制备高滴度噬菌体裂解液（10ml）。从 10ml 裂解液中取一部分能制备几微克 DNA，供进一步做 RE 分析和决定哪一些噬菌体克隆应该大规模生长。剩下的裂解液可用于进行大规模生长（12-12）或作为噬菌体克隆的贮存液保存在 4℃。

实验所需时间

第 1 天：1 小时外加 6—12 小时保温时间

第 2 天：2—3 小时制备 DNA

试剂

LB 培养基

1mol/L $MgSO_4$

氯仿

TM 缓冲液

50mmol/L Tris，pH7.4

10mmol/L $MgSO_4$

DNA 酶 I，1mg/ml 配在 TM 缓冲液中，用前稀释（Sigma）

聚乙二醇-6000（PEG-6000）

0.5mol/L EDTA，pH8.0

5mol/L NaCl

SS-苯酚

酵母 *tRNA* 溶液，10mg/ml 配在水中

方法

实验准备

从同事那里得到噬菌体克隆(例如：EMBL3，EMBL4 或 Charon 28)，或从文库中选择感兴趣的噬菌体克隆(13-5)。在准备 10ml 裂解液的前一天，按获得单个空斑的相应稀释度将选择好的噬菌体铺板（20-7）。在制备 10ml 裂解液的同一天，在 10mmol/L $MgSO_4$ 中制备接种用的新鲜 LE392 细胞(20-7)。

制备 10ml 裂解液

1. 在 50ml 有盖的无菌管中加入 10ml 含 $MgSO_4$（终浓度为 10mmol/L)的 LB 培养基。

2. 用一根无菌巴斯德吸管从贮存平板上挑出含单个空斑的琼脂转到试管中 [注释(1)]。挑出的琼脂上含约 10^7 噬菌体。

3. 加 50μl LE392 待接种的细胞到管中。

4. 通气振荡 6—12 小时。培养物应该变浑浊，然后裂解变清[注释(2)]。随着裂解明显出现细菌碎片。

5. 如果培养物不裂解，改变步骤 3 中 LE392 细胞数，并重新试。

6. 裂解后，加 100μl 氯仿到管中。37℃ 振荡 2 分钟。

7. 室温 3 000 × g 离心 10 分钟除去细菌碎片。

8. 将上层水相取到新管中，在每 10ml 裂解液中加 100μl 无菌 1mol/L $MgSO_4$ 溶液。

9. 通过一系列稀释的上清液和平板接种(20-7)，滴定 10ml 裂解液。好的裂解液每毫升含 5×10^9—10^{10} 噬菌斑。裂解液贮存在 4℃。

从 10ml 裂解液中制备 DNA[注释(3)]

10. 在 10ml 裂解液中加入 10ml TM 缓冲液和 320μl 新鲜制备的 DNA 酶 I，轻轻倒置混合。不要用旋涡振荡。小心不要让 DNA 酶污染吸管和其它仪器。

11. 室温放置 15 分钟。

12. 加 2ml 5mol/L NaCl 和 2.2g 固体 PEG-6000。使 PEG 在裂解液中完全溶解。

13. 冰浴放置 15 分钟。

14. 4℃ 12 000 × g 离心 10 分钟。

15. 倒掉上清液，沉淀重新悬浮在 300μl TM 缓冲液中，转到 1.5ml 微量离心管中。

16. 加 300μl 氯仿。充分混匀。在微量离心机上离心 5 分钟使相分离。取出上层水相，加到新管中。不要取出水相和氯仿相界面上的 PEG。用氯仿再抽提一次。

17. 向水相中加入 15μl 0.5mol/L EDTA (pH8.0) 和 30μl 5mol/L NaCl。

18. 加 350μl SS-苯酚。振荡混合。离心 5 分钟。

19. 将上层水相取到新的微量离心管中。

20. 水相中加 350μl 氯仿。充分混匀，离心 5 分钟使两相分离。取上层水相到新管中。

21. 加 875μl 乙醇，管置于冰中，冰浴 10 分钟。4℃ 离心 5 分钟，弃去上清液。

22. 沉淀用 150μl 80% 乙醇洗涤。4℃ 离心 2 分钟。弃去乙醇，真空干燥沉淀。

23. 沉淀重新悬浮在 50μl TE 缓冲液中。

24. 现在 DNA 可用于RE消化分析和电泳(5-4 和 5-5)，或亚克隆到质粒中(15-1)。如果噬菌体的最初滴度大约是 10^{10}/ml，一般每毫升裂解液可得2—5μg DNA[注释(4)]。

注释

(1) 自动吸管的负压常将琼脂块带进吸管。通过反转压力的方向将琼脂块放出。可用少量 LB 缓冲液洗去吸管中的琼脂块。

(2) 用一个有细菌但没有噬菌体的管子与其它试管一起保温。将这个对照管与样品管（由于噬菌体感染而裂解)进行比较,易于观察澄清程度。

(3) 本操作以制备 10ml 裂解液为例,但可以按比例放大或缩小。

(4) 这种制备方法产生大量细菌 RNA, 在限制性酶切的琼脂糖电泳时与溴酚蓝染料一起走在前沿。在微量噬菌体 DNA 的内切酶消化液中加 1μl(10mg/ml)不含 DNA 酶的 RNase A 可以降低 RNA 本底。为了配制不含 DNA 酶的 RNase A,可将 RNase A 以 10mg/ml 的浓度溶在水中,并在 70℃ 加热10分钟使 DNA 酶失活。

12-2 从噬菌体中大量制备和纯化 DNA

提要

有许多大量繁殖 λ 噬菌体的方法，本法只是其中之一。10ml 小规模的裂解液（12—1)用于触发大量细菌的感染。噬菌体最终能溶解掉生长在培养基上的细菌，使每毫升培养物产生 10^9—10^{10} 噬菌体。通过 PEG 沉淀将噬菌体从培养介质中纯化，然后从噬菌体制备 DNA。一般每升培养物 DNA 产量为 100μg—1mg。

实验所需时间

5 天，每天用几小时

特殊装置

超速离心机(带 SW41 和 SW60 转头的 Beckman 离心机)

超速离心管（Beckman Ultra-clear, 14 × 89 mm: SW41; Ultra-clear, 11 × 60mm: SW60)

折光仪

试剂

LB 培养基

含 10mmol/L $MgSO_4$ 的 LB 培养基(每升 LB 加 10ml 1mol/L 无菌 $MgSO_4$ 溶液）

10mmol/L $MgSO_4$

氯仿

5mol/L NaCl

PEG-6000（固体）

TM 缓冲液

50mmol/L Tris, pH7.4

10mmol/L $MgSO_4$

CsCl

CsCl/TM 溶液：0.75g CsCl 加到 1ml TM 缓冲液中(折光指数 1.3815)

0.5mol/LEDTA, pH8.0

链霉蛋白酶溶液

每毫升TE缓冲液 20mg 链霉蛋白酶 (Calbiochem)

乙醇

SS-苯酚

TE 缓冲液

方法

实验准备

实验前一天，制备 10ml 噬菌体裂解液(20-1)，并通过稀释物平板接种测定它的滴度(20-7)。在感染的当天，在 40ml LB 培养基上生长 LE392 细胞使 600nm 处的O.D.为 1.0。

分离 DNA

1. 于 50ml 聚丙烯管中的 LE392 细胞以 3 000 × g 离心 10 分钟使之沉淀。

2. 弃去上清液，细菌沉淀重新悬浮在原体积一半的(即 20ml)无菌 10mmol/L $MgSO_4$ 中，20ml 约含3×10^{10} LE392 细胞。

3. 根据对 10ml 裂解液平板接种所测出的结果(20-7)，将产生 10^9 个噬菌斑的噬菌体加到细菌中[注释(1)]。

4. 37℃ 保温 5 分钟使噬菌体吸附到细菌上。

5. 在一个无菌培养瓶里加 1L 含 10mmol/L $MgSO_4$ 的 LB 培养基，并接种自步骤 4 来的细菌。

6. 37℃ 剧烈振荡 10—12 小时直至裂解。可能溶液并不会澄清，但随着裂解会出现明显的细菌碎片。

7. 加 20ml 氯仿和 120ml 5mol/L NaCl。

8. 37℃ 振荡 5 分钟。

9. 在 500ml 离心管中于 4℃ 8 000 × g 离心 10 分钟，除去细菌碎片。

10. 水溶性的上清液倒入新瓶，小心不要移动沉淀。此时滴定制备物以测定实际的最终产量。通常最终产品至少保持 50% 最初滴度。加 10ml 1mol/L $MgSO_4$ 和 120g 固体 PEG 到上清液中。

11. 使 PEG 溶于裂解液并在 4℃ 放置 60 分钟或更长时间以沉淀噬菌体。

12. 在 500ml 离心管中 4℃ 8 000 × g 离心 20 分钟收集噬菌体。弃去上清液，将 PEG 沉淀的噬菌体从管底和管壁重新悬浮在 15ml TM 缓冲液中。悬浮的沉淀转到50ml 有盖试管中。

13. 管中加入 15ml 氯仿。剧烈混合抽提。在 30ml 玻璃离心管中以 12 000×g 离心 10 分钟使相分离。

14. 上层水相移入新的玻璃试管。如步骤13那样重复用氯仿抽提。上层水相移入新

管。通过平衡梯度离心（步骤 15 到 17），或速度梯度离心到 CsCl 阶段梯度中，可以纯化噬菌体[注释(2)]。建立阶段梯度略为复杂一些，但不需要超离心一天。两种方法都能从 *E. coli* DNA 中得到纯的噬菌体颗粒。

15. 每毫升水相加 0.75g CsCl 使密度达到 1.5g/ml。检查折光指数，以确定其应为 1.3815±0.002。如果折光指数高则加水，如果折光指数低则加 CsCl。

16. 20℃ 210 000 × g 超离心 24—36 小时，噬菌体在CsCl密度梯度中形成区带（例如在 2 个 14 × 89mm Beckman 超离心管中，在 Beckman SW41 转头上以 35 000 rpm 离心）[注释(3)]。小心不得将氯仿转入管中，因为这将使超离心管受损。离心前保证管子是满的。

17. 平衡密度梯度离心后，噬菌体形成一条在普通光下可见的乳白色窄带。如果见到两条区带，上面一条（低密度）区带代表空的蛋白质外壳，下面一条（高密度）区带是噬菌体。应该取出下面一条区带。

18. 用一个注射器和一个 18 号针头刺破管壁取出区带。这过程类似于 8-2 步骤 22 中所叙述的方法。

19. 取出来后，对噬菌体再离心作进一步的纯化和浓缩。做法是：在一个较小的超速离心管中于 CsCl/TM 溶液中离心（例如：SW60 管子在 42 000rpm、20℃ 离心 16 小时）。离心前，保证管子是满的。为了能取出区带，管子必须是可刺破的塑料管（例如 Beckman Ultra-clear，11 × 60mm）。像步骤 17 那样确定乳白色的噬菌体区带。如果制备适当，应该只有一条区带。

20. 刺破管壁取出噬菌体。当在 4℃ 下贮存于 CsCl 中时，噬菌体可保持较长时间。

从噬菌体纯化 DNA[注释(4)]

21. 对每 200μl CsCl-噬菌体带，加入 50μl 0.5mol/L EDTA(pH8)和 12.5μl 链霉蛋白酶溶液。

22. 混合物装入透析袋（透析袋的制备见 9-3）。在 37℃ 对 10mmol/L Tris(pH7.4)、1mmol/L EDTA、0.5mol/L NaCl 溶液透析 1 小时。至少用相当于透析袋 1 000 倍体积的溶液透析，透析和链霉蛋白酶的消化将同时进行。

23. 换透析液，再透析 1 小时。用微量吸管从袋内吸出透析物。

24. 在 1.5ml 微量离心管中用等体积 SS-苯酚抽提从袋内取出的透析物。在微量离心机上离心 2 分钟。

25. 上层水相移入新管。

26. 加等体积氯仿，混合，离心 2 分钟。

27. 上层水相移入新管，加 2.5 体积乙醇，置干冰中 10 分钟。

28. 4℃ 离心 5 分钟。

29. 弃去上清液，空气干燥沉淀。

30. 将噬菌体 DNA 悬浮在 500μl TE 缓冲液中，4℃ 放几小时，使噬菌体 DNA 完全溶解。重新混合并用 O. D. 测量法测定 DNA 浓度(20-3)。

31. 样品贮于 −20℃ 直到使用，例如用于 RE 酶切谱(5-4 和 5-5) 或亚克隆到质

粒中(15-1)。

注释

(1) 对于大部分 EMBL 和 Charon 28 文库的克隆，最好的噬菌体与细菌的比例在 1:10 和 1:100 之间。另一些噬菌体可能需要不同的最适比例，它们可通过经验决定。

(2) 步骤 15—17 所述的平衡 CsCl 梯度可被分级梯度代替，用于分离噬菌体，这样所需的离心时间少。为了制备梯度，需要 3 种不同密度的 CsCl 溶液：

CsCl 溶液	密　度	CsCl(g)	TM 缓冲液 (ml)
I	1.45	30	42.5
II	1.50	33.5	41
III	1.70	47.5	37.5

在 SW41 管中，加 1.5ml 溶液 I 到管底，然后在这一层下加 1.5ml 溶液 II，这两层下再加 1ml 溶液 III (小心地用吸管通过以前加入的溶液将新的溶液加入管底)。

对每毫升在 TM 溶液中的噬菌体(步骤 14)，加 0.5g CsCl。溶解 CsCl 并将噬菌体/CsCl 溶液铺在梯度顶部。离心前用 TM 缓冲液注满管子。

22 000rpm 离心 4 小时。在 1.45 和 1.50 之间的界面上噬菌体形成一条蓝色的乳白区带。有时将管子对着暗处从下面照光有助于观察区带。进行步骤18。

(3) 在离心管顶部加 CsCl/TM 溶液可能是需要的。

(4) 还有许多方法可以从 λ 噬菌体制备 DNA。

参考文献

Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York, 1982.

Yamamoto, K., Alberts, B., Benzinger, R., Lawhorne, L., and Treiber, G., *Virology* **40**: 734, 1970.

(沈信奋译　姚志建校)

第13章　真核基因组 DNA 的克隆繁殖

13-1　从真核细胞基因组克隆繁殖 DNA: 引言

为了详细分析基因的结构和功能及其附近的调控区，将基因分离为一个克隆是首要的。为了做到这一点，人们从含有该基因的细胞制备基因组 DNA 文库。这个文库将含有互相重叠的大量 DNA 片段，它们至少包含基因组所有顺序中的一个复本(即：平均大小为 15—20kb 片段有 100 万以上)。这些片段将被克隆并在适当的原核载体(一般为噬菌体)中增殖。这样产生的重组噬菌体是构建的文库中的成员，其中每一个都有它自己的克隆 DNA 片段。通过与对感兴趣基因的特异的放射性探针杂交，筛选基因组文库。这样能从其余的克隆顺序中选择出所希望的噬菌体克隆。然后，选择出来的噬菌体克隆的噬菌斑被纯化，再以类似的方法在以后的步骤中被进一步选择。将纯化的克隆进行制备性生长，得到一定量适合于详细分析的克隆化 DNA。

由于克隆繁殖的效率高，对真核细胞基因组的完整文库筛选相对容易，在建立文库中，λ 噬菌体代替了许多载体，它的应用引人注意。λ 载体是线性 DNA 噬菌体基因组可用 15—20kb 真核 DNA 代替其内部非必需的噬菌体基因而用于遗传工程中。

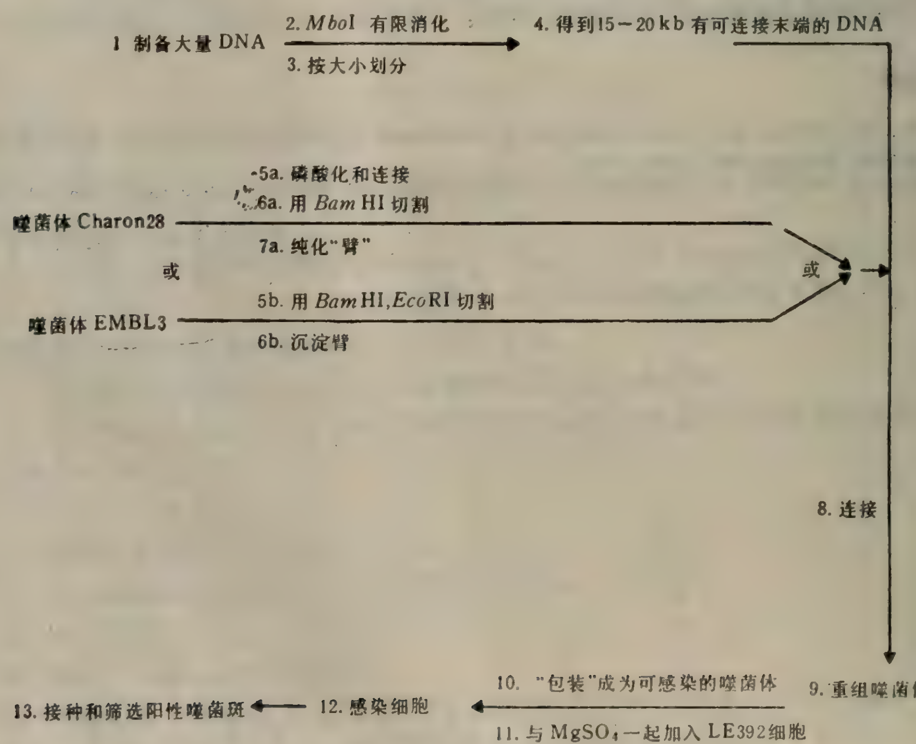


图13.1　利用 Charon 28 或 EMBL3 制备基因文库的流程图。

如果在基因组中有多种 DNA 与选择克隆所用的探针杂交，那么可用另一些方法来克隆所希望的特殊顺序。基因组印迹实验最初用来确定含有被克隆片段的基因组中 *Eco*R I 或 *Bam* HI 限制性酶切片段的大小。用相应的RE(5-4)将制备量的（约 1mg）基因组DNA 完全消化，并用制备性琼脂糖凝胶电泳分离。含有感兴趣基因的部分从琼脂糖胶上洗脱下来，或从制备性“牛眼”(bull's-eye) 琼脂糖电泳胶的阳极收集(为此 Hoefer 出售一种仪器)。纯化 DNA 并连接到相应的克隆繁殖载体上（*Bam*HI: FMBL3; *Eco*RI: EMBL4)，包装，一个按大小分部分离的文库建立起来了。这其中的一组顺序然后可用探针筛选，以选择性地克隆感兴趣的基因组区域。这些步骤简略地列于图 13.1。

第二种基因组克隆繁殖载体——装配型质粒（cosmid）已经发展起来，能克隆繁殖长度达到 45kb 的 DNA 片段。但是，除非必须克隆基因组大于 20kb 的 DNA 片段，否则构建和筛选 λ 载体文库是最简单的(见下列参考文献)。

下面几节所列的方法叙述了用 λ 载体产生基因组文库的步骤，并列出装配型质粒文库产生方法的参考文献。如果从一个相应宿主细胞来的基因组文库已经有了，那么可以跳过文库构建的方法，直接进入到接种和筛选(13-5 和 13-6)。

参考文献

Collins, J., and Hohn, B., *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **75**: 4242, 1978.

Grosveld, F., Lund, T., Murray, E., Mellor, A., Dahl, H., and Flavell, R., *Nucleic Acids Res.* **10**: 6716, 1982.

Ish-Horowicz, D., and Burke, J., *Nucleic Acids Res.* **9**: 2989, 1981.

Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982.

13-2 基因组 DNA 的制备：部分 *Mbo*I 消化法

提要

为了克隆繁殖到与 *Bam*HI 消化的噬菌体载体的相容的 RE末端上，用RE *Mbo*I 将基因组文库的大片段部分消化成 15—20kb 片段。消化后，所要的片段(15—20kb)通过蔗糖密度梯度或其它方法从小片段中分离出来[注释(1)]。这些片段连接到相应的噬菌体载体上，在体外包装，用以感染大肠杆菌宿主，以建立基因组文库。

实验所需时间

第 1 天：4 小时

第 2 天：4 小时

第 3 天：2 小时

第 4 天：2 小时

特殊装置

超离心机

蔗糖梯度形成器

琼脂糖凝胶电泳仪

试剂

10 × *Mbo*I 缓冲液

1mol/L NaCl

100mmol/L Tris, pH7.4

100mmol/L $MgCl_2$

10mmol/L DTT

*Mbo*I (NEBL)

线性蔗糖梯度，10—40%，含 **20mmol/L Tris, pH7.4, 10mmol/L EDTA, 1mol/L NaCl**

TE 缓冲液

5mol/L NaCl

SS-苯酚

氯仿

乙醇

方法

实验准备

从感兴趣的组织或细胞(5-2 或 5-3)制备适量基因组 DNA（未消化时大于 50kb)。试验 *Mbo*I[注释(2)]。

*Mbo*I 消化

1. 首先进行分析性反应，以确定为产生长度约为 20kb 的 DNA 片段所需的 *Mbo*I 消化条件。

a. 准备 4 个 1.5ml 微量离心管,每个含:

10μg 基因组 DNA（配在 10μl TE 或水中)

10 × *Mbo*I 缓冲液　2.5μl

水　12μl

b. 在 4 个管中分别加 0.2,0.5,1 或 2U *Mbo*I。

c. 37℃ 保温5、10、20和40分钟后从每管中取出 6μl。样品贮存于干冰中直到进行第二步。

d. 解冻,在琼脂糖胶上走 16 个样品(9-2),与标准分子量的标志进行比较。

e. 选择时间和 *Mbo*I 浓度,使得到的片段平均大小约为 20kb。

2. 将最适的消化条件按比例扩大 100 倍,消化 1mg 基因组 DNA。在 10—15ml 塑料管中加:

1mg 基因组 DNA　1ml *Mbo*I（根据上述的测定结果决定)

10 × *Mbo*I 缓冲液　250μl

水　　　1.2ml

按步骤 1e 中所测得的时间在 37℃ 下保温。

3. 用 2.5ml 1:1 混合的 SS-苯酚和氯仿抽提 DNA。

4. 上层水相移入新管。加 275μl 5mol/L NaCl。

5. 加 7ml 乙醇。冰浴沉淀 10 分钟。

6. 4℃ 12 000 × g 离心 10 分钟。

7. 弃去乙醇，将 DNA 沉淀悬浮在 500μl TE 缓冲液中。在 4℃ 这可能花几小时。

插入片段按大小进行分离

8. 为了达到最适分离，由步骤 7 得到的 DNA 中取 1/6(约 80μl) 放在 6 个 Beckman Ultraclear SW41 超速离心管中的蔗糖密度梯度上。用梯度形成器制备 10—40% 蔗糖(含 20mmol/L Tris, pH7.4, 10mmol/L EDTA，和 1mol/L NaCl)的线性梯度。

9. 20℃ 135 000 × g 离心16小时(例如在 SW41 转头上为 28 000rpm)。

第二天

10. 在第一个管的底部刺 1 小孔，以 1ml 为一管滴 12 管。对其它的各管也按同样的顺序滴出内容物(即合并每管的同一部分)。

11. 各取 50μl 进行琼脂糖凝胶电泳，与平行的 *Hin*dIII 切割的 λ DNA 标志比，决定哪些部分含 16—20kb 片段。

12. 合并含 16—20kb 片段的部分。加 2.5 体积乙醇。－20℃ 冷几小时。

第三天

13. 4℃ 10 000 × g 离心 10 分钟，收集 DNA。

14. 弃去上清液，将 DNA 悬浮在 160μl TE 缓冲液中。

15. 为了得到最适大小的片段，按步骤 9—14 再进行一次梯度分离(但只用 2 个梯度离心管，每个加 80μl DNA)。 第二次蔗糖梯度分离后，DNA 沉淀悬浮在 50μl TE 缓冲液中。

第四天

16. 在琼脂糖凝胶电泳后， 通过将 2.5μl 样品的溴乙锭染色强度与已知大小和浓度的 DNA 片段(例如 5μg *Hin*dIII 切割的 λ DNA)比较，以确定所制备的插入片段的大小和 DNA 浓度。

17. 调节样品的 DNA 浓度到约 0.25μg/μl 左右。－20℃ 贮存。

注释

(1) 分离 15—20kb 部分 *Mbo*I 插入片段的另一种方法是用制备凝胶电泳和电洗脱。此外，人们能用“牛眼”电泳仪，它使 DNA 从圆形胶的外面电泳进入中心。在那里DNA进入中心孔并用分部收集器收集。在琼脂糖凝胶电泳上将样品与 *Hin*dIII 切割的 λ DNA 标准比。这可以代替蔗糖密度梯度并得到大量的15—20kb *Mbo*I 片段作基因组克隆繁殖，它们在构建文库中有很好的功能。同样这种仪器

能用来选择其它大小的基因组 DNA 片段以供克隆繁殖。这个方法涉及到要买特殊仪器，我们建议用 1mg 以上基因组 DNA 开始作制备性分离。

（2）用 *Mbo*I 制备插入片段前，应该证明酶将产生能连接的末端。证实的方法是：用 *Mbo*I 完全消化 SV40 DNA 或在 dam⁻ 大肠杆菌宿主中生长的质粒，并测定 T4 DNA 连接酶能否重新把切割的 DNA 连接成高分子。

13-3 用于基因组克隆繁殖的噬菌体载体的制备

提要

制备噬菌体载体“臂”（λ 噬菌体的左和右末端），以用于连接基因组DNA 的 *Mbo*I 酶切片段。本节将介绍 2 种载体 Charon 28 和 EMBL3。

Charon 28，噬菌体基因组可取代的中心部分用 *Bam*HI 切断而去掉。然后必须通过蔗糖梯度按大小分离，除去中心部分，否则它将与克隆繁殖的插入片段竞争可用的载体“臂”。

EMBL3，其切断的可取代的中心能用第二种 RE(*Eco*RI) 去掉它的粘性末端，从而使其在随后的连接反应中没有活性。然后用异丙醇沉淀含 *Bam*HI 粘性末端的 14bp 片段。这样可以不需要蔗糖梯度纯化就能除去中心部分的片段，避免它们与真核细胞插入片段竞争与载体“臂”的连接。

实验所需时间

Charon 28：需 3 天
EMBL 3：需 1 天

特殊装置

超速离心机(用于对 Charon 28 操作)
琼脂糖凝胶电泳仪

试剂

Charon 28 DNA(BRL)
EMBL3 DNA(Promega 或 Vector Cloning Systems)
10 × T4 激酶缓冲液
  0.5mol/L Tris, pH7.4
  0.1mol/L $MgCl_2$
  0.05mol/L DTT
  0.001mol/L 亚精胺
10mmol/L ATP 配在水中，用 NaOH 调 pH 到 7.4，－20℃ 冻存
氯仿
SS-苯酚
乙醇

T4 激酶，17.5U/μl (P-L)

5mol/L NaCl

TE 缓冲液

10 × 连接酶缓冲液

T4 连接酶，100U/μl (NEBL)

*Bam*HI (BRL 或 NEBL)，10U/μl

10 × *Bam* HI 缓冲液

0.5mol/L NaCl

0.1mol/L Tris，pH 7.4

0.1mol/L $MgCl_2$

－20℃ 冻存

10 × *Eco*RI 缓冲液

0.5mol/L NaCl

1mol/L Tris，pH7.4

0.1mol/L $MgCl_2$

－20℃ 冻存

*Eco*RI，10U/μl (BRL 或 NEBL)

3mol/L 醋酸钠，pH6.0 (工作液 **0.35mol/L**)

异丙醇

方法

为了制备 Charon 28 的"臂"，粘性末端被磷酸化并互相连接形成环状基因组。中心部分用 *Bam*HI 切掉并经蔗糖梯度分离，从"臂"中分离出来。

Charon28/*Bam*HI "臂"的制备：粘性末端的磷酸化(为了有效地连接)

1. 在微量离心管中加入：

Charon 28 DNA (1μg/μl)	500μl
10 × T4 激酶缓冲液	100μl
T4 激酶	20μl
10mmol/LATP，pH7.4	100μl
水	280μl

2. 37℃ 保温 1 小时。分到 2 个微量离心管中。

3. 每管加 1 体积 (500μl) SS-苯酚:氯仿(1:1)。混匀，离心 2 分钟使相分离。上层水相取到新管中。

4. 每管加 500μl 氯仿，混匀。离心分相。

5. 水层移到新管中。

6. 每管加 50μl 5mol/L NaCl，加 1ml 乙醇。冰浴 10 分钟。

7. 4℃离心 5 分钟。

8. 弃去上清液。加 1ml 80% 乙醇洗沉淀。离心。弃去上清液。

9. 真空干燥 DNA 沉淀。

10. DNA 沉淀分别悬浮在 250μl TE 缓冲液中。合并 2 个样品并在 −20℃ 贮存。将切开的末端相互连接形成环状噬菌体基因组。

11. 将下列试剂加在一起：

磷酸化 Charon 28 DNA	500μl
10×连接酶缓冲液	100μl
T4 连接酶	50μl
水	350μl

12. 14℃ 保温 4 小时。65℃ 加热 10 分钟通过酶的热钝化终止反应。

片段的切除

13. 加 100μl 5mol/L NaCl 和 1 000 U *Bam*HI[注释(1)]。37℃ 保温 2 小时。

14. 按步骤 3—9，进行抽提和乙醇沉淀。

15. 将 DNA 重新悬浮在 480μl TE 缓冲液中。用蔗糖梯度将切除的片段（7.4kb）与连接"臂"（32.8kb）分离。

16. 按 13-2 所述，在 6 个蔗糖梯度管中从插入片段中分离"臂"，向每个梯度上加 80μl 上述混合物(约占从步骤 15 得来的混合物总体积的 1/6)。

17. 离心、收集、分析(13-2)。合并含 32.8kb "臂"的部分。从管底数起的第一峰是"臂"。在琼脂糖胶上对梯度分离的部分进行电泳可以确证(5-5)。小心含 7.4kb 中心片段的污染。

18. 加 2.5 体积乙醇，−20℃ 冷几小时或过夜。

第二天

19. 4℃ 12 000 × g 离心10分钟。弃去上清液。

20. 用 1ml 乙醇洗沉淀，离心，弃去上清液，空气干燥沉淀。

21. DNA 以 0.5μg/μl 悬浮在 TE 缓冲液中，−20℃ 冻存。用琼脂糖凝胶电泳和溴乙锭染色(9-1)检查"臂"的纯度和 DNA 浓度。与已知的 DNA 标准比较，以下操作进入 13-4。

EMBL 3 臂的制备

用 *Bam*HI 消化 EMBL3 释放出中心片段。再用 *Eco*RI 消化，从中心片段上除去 *Bam*HI 末端，结果它不再与部分 *Mbo*I 酶解的插入片段竞争与载体臂的连接。异丙醇沉淀以选择性地除去被 *Eco*RI 切割的 *Bam*HI 末端。

用 *Bam*HI 消化 EMBL 3 DNA

1. 加入下列试剂：

EMBL 3 DNA (500μg)	500μl
10 × *Bam*HI 缓冲液	100μl

*Bam*HI (10U/μl)　　　　100μl

水　　　　300μl。

2. 37℃ 保温 2 小时。

3. 按 Charon 28 制备中的步骤 3-9。用氯仿抽提和沉淀。

4. 沉淀重新悬浮在 500μl TE 缓冲液中。

用 *Eco*RI 消化 EMBL 3 DNA

5. 加入下列试剂

从步骤 4 来的 DNA　　500μl

10 × *Eco*RI 缓冲液　　100μl

*Eco*RI(1 000U)　　100μl

水　　300μl

6. 37℃ 保温 4 小时。

7. 按 Charon 28 制备中的步骤 3—9,抽提、沉淀和回收。

8. 沉淀重新悬浮在 500μl TE 缓冲液中。

异丙醇沉淀

9. 在 500μl 从步骤 8 来的 DNA 中加: 75μl 3mol/L 醋酸钠(pH6.0)和 300μl 异丙醇,并置于 1.5ml 微量离心管中。

10. 冰浴 15 分钟。

11. 4℃ 离心 10 分钟。

12. 倒出上清液,用 200μl 0.35mol/L 醋酸钠:乙醇(1:2.5)洗沉淀。

13. 4℃ 离心 10 分钟。

14. 重复步骤 12 和 13。

15. 弃去上清液,真空干燥沉淀。

16. 将"臂"以 0.5μg/μl 溶解在 TE 缓冲液中[注释(2)]。

17. －20℃ 贮存，进行 13-4 的操作。

注释

(1) 建议测定一下用于制备克隆载体的 *Bam*HI RE 是否能产生出高比例的粘性末端。一种质粒,例如 pBR322 能被 *Bam*HI 完全切开,然后用 DNA 连接酶将 *Bam*HI 切割的质粒重新连接起来。切割和重新连接的片段在琼脂糖凝胶电泳上应该显示: 在此重新连接的样品中,其 95% 以上 DNA 染色是处于连接形式。否则,这批 *Bam*HI 不可能给出好的结果。

(2) 检查"臂"的回收是重要的,为了做到这一点,取一部分样品加热到 60℃ 以溶解粘性末端,走琼脂糖凝胶电泳,并与同样加热到 60℃ 的已知量 *Hin*dIII 切割的 λ DNA 比较。 通过与已知 DNA 标准比 EB 染色强度来测定"臂"的浓度。

参考文献

Blattner, F., et al., *Science* **196**: 161, 1977.

Frischauf, A. M., Lehrach, H., Poustka, A., and Murray,N., *J. Mol. Biol.* **170**: 827, 1983."Molecular Biologicals," Promega Biotec, 1984.

13-4 基因组 DNA 连接到噬菌体臂上并包装形成文库

提要

制备经*Mbo*I 部分消化的基因组 DNA，将其连接到已准备好的噬菌体"臂"上。为了得到合适的文库，根据一系列试验的经验测定基因组 DNA 片段与克隆繁殖载体的最适比。基因组 DNA 片段的剩余部分即以此最适比连接到载体上，并使重组噬菌体在体外包装。包装好的噬菌体用于感染相应的大肠杆菌宿主(例如 LE392)，产生文库。

实验所需时间

第一天：1 小时

第二天：4 小时

试剂

10×连接酶缓冲液

T4 DNA 连接酶，100U/μl (NEBL)

TMG 缓冲液 (Tris，$MgSO_4$，明胶)

包装用抽提物(例如：从 Promega Biotec 生产的 Packagene)

方法

实验准备

制备经 *Mbo*I 部分消化的插入片段(3-2)。制备用于插入的载体"臂"(13-3)。

连接[注释(1)]

1. 为了达到产生文库的最大效率，必须从少量一系列连接和包装的反应中，经验性地测定插入片段与载体的最适比。可采用下列操作法：在 5 个 1.5ml 微量离心管中(标 A—E)加入下列试剂：

10×连接酶缓冲液	1μl
"臂"(0.5μg/μl)	2μl

2.

在每个试管中加入	A	B	C	D	E
*Mbo*I 插入片段 (0.25μg/μl)	—	1μl	2μl	3μl	4μl
水	6μl	5μl	4μl	3μl	2μl

每管加 1μl T4 DNA 连接酶，每管总体积为 10μl。

3. 稍离心使内容物沉淀于管底并混合。14℃保温 12—16 小时。连接物贮存在 -20℃ 直至准备包装。

包装

4. 为了简单和方便，这一步可用商品包装抽提物(例如：Promega 生产的 Packagene)，每管 10μl 连接物，按产品说明所提供的操作进行包装。这包括将连接产物与包装用抽提物的样品混合，22℃ 保温 2 小时。如果选择自己制备的包装用抽提物，那么可按照一些已发表的方法做(见下面的参考文献)。

5. 包装后，混合物用 TMG 缓冲液稀释到 250μl。包装的 DNA 贮存在 4℃，决不要冰冻。

6. 从这些稀释液中取一部分接种，测定制备文库的最适比(13-5)。以最适比进行若干次连接和包装反应并合并。滴定制备的文库并接种以进行筛选或扩增(13-5—13-7)。

注释

(1) 保证"臂"和 *Mbo*I 插入片段在 EDTA 浓度小于 1mmol/L 的溶液中稀释；否则连接和包装过程可能进行得不好。

参考文献

Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982.

13-5 包装好的文库的滴定和平板培养

提要

本方法用于评价产生克隆的最适的连接和包装条件。滴定被包装的连接产物的不同稀释物，以测定制备文库的最适条件。在制备型文库形成后，噬菌体可以接种以进行筛选，或文库可被扩增。

实验所需时间

第一天：2 小时
第二天：2 小时

试剂

LB 培养基
麦芽糖(20% 重量/体积，高压灭菌)
10mmol/L $MgSO_4$
LB 顶层琼脂含 **10mmol/L $MgSO_4$**
LB 琼脂板
LE 392 细胞
LB 顶层琼脂糖
0.8g 琼脂糖加到 100ml LB 培养基中

高压灭菌,冷却到48℃,加 1ml 灭菌的 1mol/L $MgSO_4$

方法

实验准备

按13-4中所述,以多种载体/插入片段的比例连接和包装基因组 DNA。

制备接种的细胞

1. 在 500ml 无菌培养瓶中的 100ml 无菌 LB 培养基(含 2ml 麦芽糖溶液中)接种新鲜的 LE392 细菌菌落[注释(1)]。生长到 600nm 波长时的 O. D. 接近 1.0。

2. 置于2个无菌的 50ml 螺盖聚丙烯管中,2 500×g 离心10分钟收集细胞。

3. 弃去上清液。每管中的沉淀重新悬浮于 25ml 无菌的 10mmol/L $MgSO_4$ 中。产量约 $1—2\times10^9$ 细胞/ml。

4. LE 392 细胞能在4℃贮存2周以上。超过此贮存期接种效率可能略有下降。

接种λ噬菌体(或包装 DNA)以测定滴度

5. 从每 250μl 包装反应(13-4 步骤5)物中取 1μl加到 99μl TMG中。 分别将 1μl 和10μl 的这种稀释液加到一系列 13×100mm 管里。 必须保证将没有插入物的克隆繁殖载体(由13-4中的A管得到)做同样的稀释和接种,用作空白对照。

6. 每管加入从步骤4得来的 200μl LE 392 细菌。混合。室温放置20分钟。

7. 在48℃加 2.5ml 含 10mmol/L $MgSO_4$ 的 LB 顶层胶。在室温立即将每管加到 LB 琼脂板上(20-6)。旋转铺平顶层胶。

8. 在室温下使顶层胶凝固5分钟,倒置平板并在37℃保温8—16小时。融合生长的 LE392 细胞上由于细菌溶解而出现空斑区。

9. 计算每种包装反应的滴度。计数每个平皿的空斑数并与空白对照比较(见步骤5)。如果文库构建是成功的,那么在最适浓度时,有插入片段的样品与没有插入片段的样品比,滴度至少高5—10。

扩增

10. 如果需要扩增,在最适条件下用足够产生一个文库的样品反复连接和包装,但不得扩大反应的规模[注释(2)]。对哺乳动物基因组来说,一个合理的目的基因文库大小为 $1—2\times10^6$ 空斑。合并包装混合物,通过接种滴定此混合物以测定该文库中所产生的噬菌体数,或文库的基数。

11. 下面7步叙述了接种文库用于筛选。如果需要筛选前扩增文库,则参阅13-7的作法,并在扩增后回到步骤12。

接种文库用以筛选

12. 一般说来,通过在每块 90mm LB 琼脂板上接种约 10^4 噬菌体,筛选 $5\times10^5—10^6$ 噬菌体(总量为50—100块板)[注释(3)]。开始取20ml接种用的LE 392细菌加入无菌塑料有盖管中(步骤4,在10mmol/L $MgSO_4$ 中),加入 $5\times10^5—10^6$ 已滴定过的包装混合物(或

预先扩增并滴定过的文库)，混合。

13. 室温放 20 分钟使噬菌体吸附到细胞上。

14. 吸 200μl 吸附的细菌为一份，分别加到 50—100 个无菌 13 × 100mm 玻璃管中。

15. 每管加入 2.5ml 融化的 48℃ 无菌 LB 顶层琼脂糖，并立即加到 LB 琼脂板上(室温)，旋转铺平。

16. 令顶层琼脂糖在室温凝固 15 分钟。将平板反转并在 37℃ 保温 8—16 小时。

17. 在此期间噬菌斑开始形成[注释(4)]。

18. 贮存于 4℃ 直到筛选。

注释

(1) LB 培养基、$MgSO_4$、琼脂等必须灭菌后使用。麦芽糖将增加宿主菌上 λ 噬菌体受体数。

(2) 例如：假如最适连接的产量为 2×10^5 噬菌斑/管，那么这样的 10 管合并可得到 2×10^6 噬菌斑。

(3) 此外能用 150mm 板，每板种 2×10^4 噬菌体。如果用这些较大的板，那么在步骤 14 中将用较大的试管，步骤 15 中用 7ml 体积。

(4) 为了做最适的筛选，噬菌斑应该是明显的，但又要不太大，以致不会在板上产生融合的噬菌斑。为了在适当的时候停止噬菌斑体积增大，8 小时后仔细观察。并当噬菌斑开始出现时，将板移到 4℃。在4℃ 让噬菌体继续生长一会儿。

13-6 用放射性标记的探针筛选平板培养的文库

提要

本法叙述了通过与放射性探针杂交来筛选噬菌体克隆的步骤。从铺板接种的噬菌体来的 DNA 转到圆形 NC 滤膜上与标记探针进行杂交(从 7-1 缺口翻译或 6-2 中合成探针的 ^{32}P 末端标记来的探针)。几轮接种铺板和筛选将产生纯的噬菌体克隆用于进一步生长和特性测定。

实验所需时间

1 周

试剂

0.2mol/L NaOH 含 1.5mol/L NaCl

2 × SSC 含 0.4mol/L Tris, pH7.4

2 × SSC

杂交缓冲液 *N* 或 *S*

鲑鱼精 *DNA*, 2mg/ml

10mol/L *NaOH*

2mol/L *Tris*, pH7.4

1mol/L *HCl*

含 10mmol/L $MgSO_4$ 的 LB 顶层琼脂

TMG 缓冲液

方法

实验准备

以适当密度将文库(或扩增的文库)铺板接种(见 13-5)以供筛选。

转移到膜上

1. 翻过平皿使琼脂一面朝下并移去皿盖。室温空气干燥约 30 分钟。

2. 用墨水(例如 Skilcraft 笔)对每个平皿标上数字并标记相应的 NC 滤膜(例如:S & SBA 85,82mm)。

3. 小心地在琼脂上方放滤膜,有数字的一侧向上。在 0.5—1 分钟内浸湿滤膜,放约 20 分钟使噬菌斑吸附到 NC 上。

4. 为了提供滤膜与平板的方向(这是非常重要的),用一个清洁的 18 号针头(沿外缘不对称地)通过滤膜和琼脂糖刺 5—10 个孔。

5. 用平头镊子小心和缓慢地从平板上取下滤膜。不要移动含噬菌体的琼脂糖顶层。用记号笔在平板底部标出针孔。

6. 滤膜数字面朝下,室温干燥 30 分钟左右。每个平板再进行第二次转印。第二次转印用于消除假阳性,因为所有真正的阳性在二次转印中应该在同一部位杂交。此外,第二次转印的滤膜可以与第二种探针杂交。

7. 依次将滤膜浸入 100ml 下列 3 种溶液中(每种 30—60 秒):

   0.2mol/L NaOH, 1.5mol/L NaCl

   2 × SSC, 0.4mol/L Tris, pH7.4

   2 × SSC

   每浸 25 次膜就更换溶液。

8. 有噬菌体的一侧向上,在 Whatman 3MM 滤纸上于室温将 NC 滤膜干燥 1 小时。

9. 80℃ 真空炉干燥 2 小时。

与滤膜杂交

10. 在杂交缓冲液中浸湿所有滤膜。对缺口翻译的探针用N缓冲液,对合成探针用S缓冲液。

11. 在 1L 的烧杯中放入滤膜并加足量杂交缓冲液以覆盖滤膜(每 100 张滤膜约 250ml)。

12. 制备杂交探针。如果用合成探针加 10^6cpm/ml 并按步骤 14 进行。0.25μg 比活性约 10^8cpm/μg 的缺口翻译探针转到 50ml 螺盖管中。加 0.5ml (2mg/ml) 鲑鱼精 DNA 溶液。为了使 DNA 变性,依次加入 50μl 10mol/L NaOH、300μl 2mol/L Tris (pH7.4)、500μl 1mol/L HCl(沿管壁逐滴加入),并在振荡器上混匀。

13. 将此变性的探针加到有滤膜的缓冲液的烧杯中。旋转混合。

14. 42℃ 振荡培养（轻轻搅动）4—16 小时，使缺口翻译探针杂交。对于合成探针保温温度可能改变，见 6-3。

洗滤膜

15. 从烧杯中倒出杂交缓冲液[注释(1)]。加入500ml含0.1%SDS(w/v)的 2×SSC洗滤膜。室温轻轻摇动 15 分钟。如果用合成探针，按 6-3 的方法洗涤，然后进行步骤 18。

16. 按步骤 15，倒掉溶液再洗 2 次。在用低盐缓冲液洗之前用纸巾吸干滤膜。

17. 在 52℃ 用 500ml含0.1%SDS的 0.1×SSC洗滤膜（15 分钟）2 次以上[注释(2)]。

18. 去掉洗涤缓冲液。用 Whatman 3MM 滤纸吸干滤膜，并在空气中干燥 1 小时。

19. 将 NC 滤膜放到几张 3MM 滤纸上，用放射性墨水在 3MM 滤纸上作标记。用清洁的塑料膜盖好已固定的滤膜。在带增感屏的 XAR-5 胶片上曝光（−70℃）过夜，直到能检测出可能的阳性讯号[注释(3)]。

第二级筛选

20. 取 200μl LE 392 指示细胞（见 13-5 步骤 4）到一个 13 × 100mm 管中。加入 48℃含 10mmol/L $MgSO_4$ 的LB顶层胶 2.5ml。在室温立即倒入 90mm LB琼脂板，室温冷却 5 分钟，形成一层细菌细胞。在平板底部划大约50个格子用于接种噬菌体[注释(4)]。

21. 有放射性墨水标记的胶片放在滤膜上对好。用记号笔在胶片上滤膜定位孔处作上标记。用一个灯来帮助定位。将有阳性克隆的平板放在有阳性克隆的X线片上对好位置（在胶片和平板上作出标记）[注释(5)]。

22. 用牙签在文库平板上的有阳性放射自显影信号的区域上触一下（可用 20 根牙签覆盖整个阳性区）。

23. 将牙签上的噬菌体转到长细菌的平板的各个方格中（牙签末端轻轻刺入琼脂）。

24. 倒置平板，37℃ 保温过夜。

25. 按步骤 1—19 放上 NC 滤膜，进行筛选。

第三级筛选

26. 第一次阳性的每个噬菌斑用牙签种到第二块平板上进行杂交，阳性噬菌斑再用牙签转移（约 10^6—10^7 噬菌体）。

27. 将牙签浸入到有 10ml 无菌 TMG 缓冲液的无菌管中。振荡混合使噬菌体分散。

28. 从步骤27取 0.25μl 和 2.5μl TMG 混合液加到 2 个含 200μl LE392 细胞（13-5 步骤 4）的无菌 13×100mm管中[注释(6)]。加入 2.5ml 含10mmol/L $MgSO_4$ 的LB顶层琼脂（48℃）。室温下立即加到 90mm LB 琼脂板上，铺平。室温凝固 15 分钟。

29. 倒置平皿，37℃ 保温过夜。每个平皿应该形成 50—500 个分散的噬菌斑。

30. 用清洁的牙签从 100—200 个分散良好的噬菌斑中将噬菌体转到有LE392细菌生长的板上（按步骤 20 第二级筛选那样画好格子）。对每个三级筛选克隆重新进行分析 。

31. 倒置平板，37℃ 保温过夜。

32. 按步骤 1—19，杂交和筛选第三级的平板。阳性点是提纯的噬菌体。现在对每个

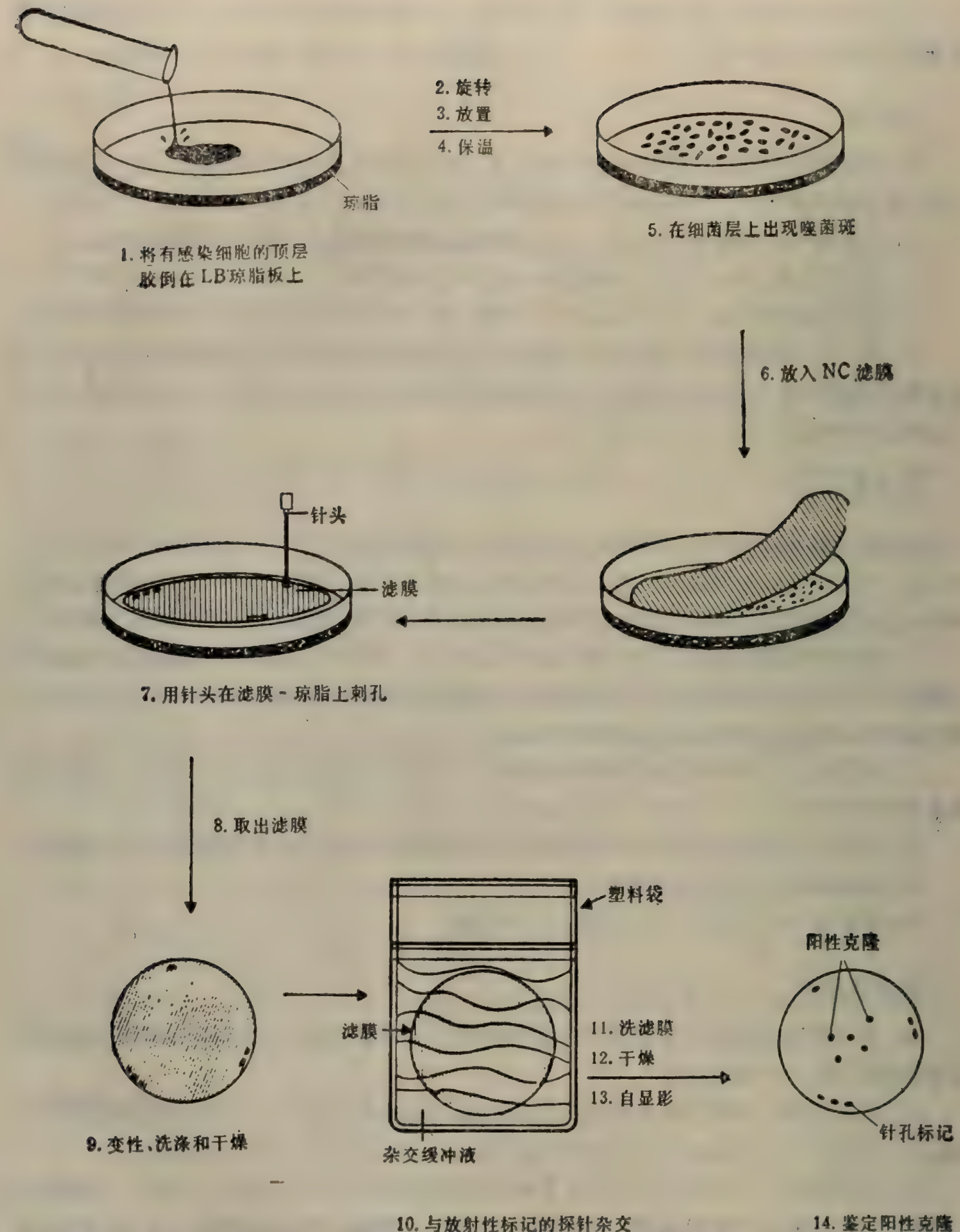


图 13.2　筛选基因文库中的阳性克隆。接种后生长到适当密度，噬菌体移到一张 NC 或尼龙滤膜上。滤膜上的 DNA 与放射性标记的探针杂交，通过滤膜的放射自显影测定出产生感兴趣 DNA 的噬菌体位置。为了确定阳性斑的位置，在平板、滤膜和自显影图相应位置上做好标记是重要的。

第一次阳性来的“优胜者”的一个代表，用牙签转到 5ml TMG 缓冲液中，如步骤26。

33. 加 1μl TMG 混合液到 200μl LE392 细胞中(13-5 步骤 4)，按步骤 28 和 29 制板。倒置平板，37℃ 过夜。

34. 在此平板上的所有噬菌斑代表了该克隆提纯的噬菌斑。 用 parafilm 封好此平板，贮存于 4℃ 作为克隆保存物。从平板上取出的单个噬菌斑能用于此噬菌体的大量生长(12-1 和 12-2)。

注释

(1) 安全地处置好放射性物质。

(2) 如果在探针和被筛克隆间存在不完全的同源性，那么对洗涤的要求就可降低(例如：较低的洗涤温度)。同样对寡核苷酸探针的杂交和洗涤条件是不同的，必须个别调整，对所用的寡核苷酸探针根据经验找出最适条件。

(3) 在 NC 滤膜上用放射性墨水做标记为了能与 X 线胶片重新对齐。

(4) 有格子的平板能买到。

(5) 一个有灯的匣子将有助于对齐位置。

(6) 如果微量吸管不能加 0.25μl，可以用 TMG 缓冲液作1:10稀释，然后加 2.5μl。

参考文献

Benton, W., and Davis, R., *Science* 196: 180, 1977.

13-7 文库的扩增

提要

本法用于在合适的宿主菌中扩增基因组或 cDNA 文库。 扩增一般产生 10^4 以上文库复本，从而保持进一步筛选所需的量。如果有些噬菌体克隆在扩增期间比另一些生长更有效，那么会改变要扩增的文库。因此在扩增前最好先筛选出一部分文库(13-6)。

实验所需时间

第一天：0.5 小时

第二天： 1 小时

试剂

LB 软琼脂

加 1.5g 琼脂到 500ml *LB* 培养基中，高压灭菌，冷却到 48℃，加 5ml 无菌的 1mol/L $MgSO_4$

NaCl (结晶)

氯仿

LB 琼脂平板

方法

实验准备

制备铺板接种用的 LE392 细胞(13-5 步骤 1—4)。 制备和滴定含待扩增的文库的

包装混合物(13-1 和 13-5)。

操作步骤

1. 对每 2×10^4 个文库组成成分，在一无菌的 13×100mm 管中将 200μl LE392 细胞与含约 2×10^4 噬菌体的已滴定过的包装混合物混合。因此一般扩增一个约 2×10^6 空斑的完整文库将需要 100 个管子。室温培养 20 分钟完成吸附。

2. 每管加入 2.5ml 含 10mmol/L $MgSO_4$ 的软琼脂(48℃)，在室温下立即倒在 90mm LB 琼脂板上，铺平。不要倒置平板或使琼脂滑出。37℃ 生长 6—10 小时。

3. 当平板开始形成针尖状噬菌斑但还未长大融合前，用无菌的塑料刮刀或弯曲的玻璃吸管取出软琼脂，从平板上移到 1L 的无菌烧杯中。对每 100ml 体积加 2ml 氯仿。

4. 混合物在无菌锥形管中以 3 000×g 离心 10 分钟。琼脂和细菌碎片在管底形成沉淀。取出含扩增的文库的上清液。

5. 测量体积。加足量结晶 NaCl 使浓度达 1mol/L。

6. 通过稀释和种板法（20-7）滴定扩增的文库。一般滴度是 5×10^9—10^{10}/ml 噬菌体。

7. 在无菌试管中，以 1ml 分装文库并加 3 滴氯仿，在4℃贮存。

8. 每次种板和筛选前重新滴定文库。

（沈倍奋译　姚志建校）

第14章 cDNA 克隆繁殖到 λgt10 和 λgt11 中

14-1 cDNA 克隆繁殖载体 λgt10 和 λgt11 的制备

cDNA 克隆与基因组 DNA 克隆的区别在于前者代表一种 mRNA 的永久性复本因此 cDNA 克隆代表基因中被表达为 mRNA 的部分，在这个最简单的例子中，没有基因组 DNA 中所包含的内含子，通常也没有调节顺序。从实践的观点来说，基因组 DNA 文库可通过将适当地消化后的基因组与制备好的载体相连接而建立，而 cDNA 文库则需通过一系列的酶反应来建立，首先要产生"第一条链"，也即与 RNA 互补的 DNA 链，然后再将 RNA 链移去并用 DNA 的"第二条链"来代替，随后再将此新的双链 DNA 连人合宜的载体。基因组 DNA 克隆繁殖载体通常能容纳 4—20kb，而 cDNA 克隆载体的容纳量则不能超过 6—8kb。

λgt10 和 λgt11 是由 Richard Young 和 Ronald Davis 设计的为了从真核细胞 mRNA 建立 cDNA 文库的噬菌体克隆繁殖载体。它们对从小量 DNA 产生许多克隆是十分有效的(也即每纳克 cDNA 约 5 000 克隆)。又因为筛选和操作噬菌体斑与筛选细菌克隆相比技术上优越很多，这两种载体在建库方面比 pBR 优点多。

λgt10 载体在合适的宿主中与未携带 cDNA 的载体相比，在溶菌生长方面有强的生物选择性。cDNA 插入到 λgt10 中后使噬菌体的抑制基因 (cI) 失活。当 λgt10 接种到 c600 的 hflA (高频率溶原性)变异体上时，仅携有 cDNA 插入片段的噬菌体才形成溶解性菌斑，而在非 hfl 的 c600 宿主上，携有插入片段与不携有插入片段的噬菌体都形成噬菌斑。

λgt11 缺乏上述的选择性，但它是一个蛋白质表达 cDNA 克隆繁殖载体。cDNA 插入片段在 λgt11 上是被克隆到 β-半乳糖苷酶基因编码区 (lac Z) 的羧基端。因此，插入的 cDNA 片段可能表达为 β-gal-cDNA 的融合蛋白。由一给定类型的 mRNA 衍生来的 6 个重组体中就有一个预期会有合适的阅读框和方位供正确翻译。当 lac Z 基因用异丙基-β-D-硫代半乳糖吡喃糖苷 (IPTG) 诱导时，此融合蛋白就被表达，即可用抗体探针来检测。同时，cDNA 的插入使 lac Z 基因产物失活。由 lac $Z^-$$\lambda$gt11 噬菌体在 lac Z^- 宿主上形成的噬菌斑不能代谢 5-溴-4-氯-3-吲哚基-β-D-半乳糖苷(5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside，(Xgal)，从而形成透明的噬菌斑。LacZ^+ 非重组体(没有插入片段的 λgt11) 是 gal^+ 并能代谢 Xgal，产生蓝色的噬菌斑。这就提供了一种比较颜色的选择法，可区别出有插入物的透明斑与无插入物的蓝色 λgt11 噬菌斑。λgt11 与 Y1090 大肠杆菌宿主一起生长。

实验所需时间

从制备 RNA 到开始对文库做筛选的全部步骤约需 2 周

试剂

大肠杆菌 c600 和大肠杆菌 c600 hflA 用于 λgt10,Y1090 和 BNN97 用于 λgt11 [Y1090 和 BNN97(ATCC 号 37194,其基因组中含 gt11)可由 American Type Culture Collection 得到]。菌种和载体也可从 Vector Cloning System 和 Promega Biotec 买到。

强化的 LB 在 LB 培养基中顺序加入下列无菌过滤的贮存液,至最终浓度为:

2mmol/L　$MgSO_4$

4μmol/L　$FeSO_4$

0.1mmol/L　$CaCl_2$

0.15%　葡萄糖

10x *Eco*RI 缓冲液

700mmol/L, pH7.4 Tris

500mmol/L　NaCl

50mmol/L　$MgCl_2$

亚精胺,400mmol/L, pH7.0, 分装贮存在−20℃

*Eco*RI(NEBL BRL)

SS-苯酚

氯仿

5mol/L *NaCl*

乙醇

TE 缓冲液

100mmol/L Tris,pH8.0, 含 1mmol/L $MgCl_2$

氨苄青霉素 50mg/ml 贮存液(分装贮存于−20℃)

重建 LCIP

冰冻干燥的小牛小肠磷酸酯酶 (BM)

在下述溶液中配成 0.6U/μl:

100mmol/L Tris,pH8.0

10mmol/L $MgCl_2$

0.1mmol/L $ZnCl_2$ (或 0.1mmol/L $ZnSO_4$)

加等体积甘油(至 50%)。分装贮存于 −20℃

方法

λgt10 克隆繁殖载体的培育

λgt10 克隆繁殖的"臂"有商品供应。如果克隆繁殖载体未买到, 可按步骤 1—17 来进行制备。 否则则可直接进入 14-2 的操作。 λgt10 为 cI^+, 已证实难以在液体培养基中生长到高的滴度。本生长方法已被充分证实可由这种噬菌体中制备 DNA。

高滴度裂解液的制备

1. 大肠杆菌 c600 于振荡条件下,在强化的 LB 培养基中生长至 600nm 处的 O.D.

值为 0.1—0.2。

2. 以一无菌的巴斯德吸管由贮存板(按 20-7 的方法制备，c600 为宿主细胞)上压出的噬菌斑接种到 10ml含c600 的生长液中。

3. 37℃ 剧烈振荡 4—6 小时，直至溶菌出现(出现细菌细胞的碎片，溶液澄清，培养液起泡)。加 2 滴氯仿并在 37℃ 振荡 5 分钟。1 500 × g 离心去除细菌碎片，并倾出上清液。将上清液贮存在 4℃ 冰箱中。此即含噬菌体的裂解液。

4. 以 c600 为宿主，按 20-7 的方法做连续稀释和划线接种，以滴定噬菌体贮存液(约为 5×10^9pfu/ml)。噬菌斑的中间应是混浊的，说明是 cI^+ 表型。

5. 在 1L 强化的 LB 培养液中培养大肠杆菌 c600 至 600nm 处的 O. D. 约为 0.2。

6. 将细胞与 2×10^9pfu 的贮存液共同保温(第 4 步)。剧烈振荡 4—6 小时至裂解。

7. 用连续稀释和划线接种的方法滴定生长的情况。它应该是 3×10^9pfu/ml。

8. 按 12-2 步骤 7—31 浓缩噬菌体并制备噬菌体 DNA。

克隆繁殖"臂"的制备：*Eco*RI 消化

9. 在一只 1.5ml 微量离心管中移入 100μg λgt10 DNA (溶于 380μl TE 缓冲液中)

10. 加入：

4.5μl 10 × *Eco*RI

4.5μl 400mmol/L 亚精胺，pH7.0

250U *Eco*RI

11. 37℃ 消化 2—3 小时。为了有效地进行 cDNA 克隆繁殖，使其完全消化是重要的。

12. 用 450μl SS-苯酚和氯仿的混合物(1:1)抽提。充分混合，置微量离心管中离心 2 分钟。上层水相取到新管中。

13. 加 450μl 氯仿至水相中，混合，并离心 2 分钟。将上层水相移入一新的管子中。

14. 50μl 5mol/L NaCl。

15. 加 1ml 乙醇，将试管在干冰中冰冻 10 分钟，置微型离心机中 4℃ 下离心 2 分钟。

16. 倾出上清液，用 500μl 80% 乙醇涮洗沉淀。微型离心机上离心 1 分钟。

17. 倾出乙醇。空气中干燥沉淀物。再加入 400μl TE 缓冲液以重新悬浮 λgt10"臂"，—20℃贮存直至使用。注意：乙醇沉淀后，噬菌体 DNA 可能会难以重新悬浮，需要将 DNA 置 TE 缓冲液中 4℃ 过夜，以令其完全重新悬浮。以下进入 14-2 的操作。

λgt11 克隆繁殖载体的制备

注意：高质量的 λgt11 脱磷酸 *Eco*RI "臂"有商品供应 (Promega Biotech, part of Protoclone GT System)。如果要自己制造脱磷酸化的"臂"，按下列方法培育 λgt11。因为 λgt11 含有 cI857 温度敏感阻遏物，制备噬菌体的最简单方法是将温度调到 43℃ 以

使阻遏物失活并诱导 λgt11 BNN97 溶素原，用氯仿使大肠杆菌裂解并释放出噬菌体。如果购买"臂"，则可直接进入 14-2。

λgt11 "臂"的准备

1. 将菌种划线到 LB 琼脂板上以得到单个的 BNN97 集落。置 32℃ 培育。

2. 将几个单独的集落划到 2 块 LB 琼脂平板上，以检查溶素原的温度敏感性。一块板在 32℃ 培育，另一块在 43℃ 培育。好的温度敏感溶素原将仅在 32℃ 上生长。

3. 向 10ml 的 LB 培养液接种已确定的温度敏感集落。32℃ 振荡培养过夜。

4. 在 1L 含 10mmol/L $MgSO_4$ 的 LB 培养基中接种上述由第 3 步骤得到的培养过夜的 10ml 培养液。在32℃ 剧列振荡下培育至 600nm 的 O. D. 达到 0.5—0.7。

5. 将三角烧瓶放入热水浴中振荡以迅速提高温度到 43℃ 来诱导溶素原，在 43℃ 剧烈振荡 15 分钟。注意维持恒定的温度。

6. 38℃ 下剧烈振荡培养 3 小时，小心维持足够高的温度(超过 37℃)以进行诱导。

7. 向培养液中加入 10ml 氯仿以裂解细菌。37℃ 振荡 5 分钟。

8. 加 120ml 5mol/L NaCl。

9. 以 12-2 中操作步骤 9—31 的方法制备噬菌体和 DNA。

10. 用 *Eco*RI 消化制备的 DNA 并提纯，如制备 λgt10 中的步骤 9—16。用 400μl 含 1mmol/L $MgCl_2$ 的 100mmol/L Tris(pH8) 重新悬浮消化的 DNA。

去磷酸化的 λgt11、*Eco*RI "臂"

11. 向 100μg *Eco*RI 消化的 λgt11 中加入 10μl 重建的 LCIP，在 1.5ml 微型离心管中用缓冲液(如步骤 10)重新悬浮。

12. 37℃ 保温 1 小时。

13. 加入 400μl SS-苯酚和氯仿(1:1)混合物。充分混合，在微型离心机中离心 5 分钟。

14. 将上层水相移入一根新的管子中，加 400μl 氯仿。混合。在微型离心机离心 1 分钟。

15. 将上层水相移入一新的试管中，加 50μl 5mol/L NaCl。

16. 加 1ml 乙醇。充分混合，在干冰上冰冻 10 分钟。置微型离心机中 4℃ 离心 2 分钟。

17. 倾出上清液。

18. 用 500μl 80% 乙醇涮洗沉淀。

19. 微型离心机中离心 1 分钟。

20. 倾去乙醇。置空气中令沉淀干燥。

21. 将去磷酸化的 λgt11 DNA 重新悬浮于 400μl TE 缓冲液中。噬菌体 DNA 可能难于悬浮。有时需在贮存前将沉淀在 4℃ 下置 TE 中于置过夜，以便其溶解。

22. 贮存于 －20℃ 直至需用时。

参考文献

Huynh, T., Young, R., and Davis, R., Constracting and screening cDNA libraries in λgt10 and λgt11.

In: DNA Cloning: A Practical Approach (D. Glover, ed.), IRL Press, Oxford, 1984.
Young, R., and Davis, R., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 80:1194,1983.

14-2 从真核细胞 mRNA 制取 cDNA 插入物

提要

由真核细胞分离 mRNA 并用于制取准备插入到 λgt10 或 λgt11 噬菌体中的 cDNA [注释(1)],这是一个为制备插入物的冗长的、涉及到多方面的操作程序。有下列步骤:

1. 分离总 RNA 并在寡 (dT) 纤维素上选择出聚 (A^+)RNA。
2. 浓缩聚(A^+) RNA(10μg/10μl)。
3. 经反转录制取 mRNA 的互补复本 (cDNA)。
4. 用 RNase H 部分分解 RNA,通过 DNA 聚合酶①产生的 DNA 将其补充以合成第二条链。
5. 用 *Eco*RI 甲基化酶和 S-腺嘌呤蛋氨酸将内部的 *Eco*RI 作用点甲基化,以保护 cDNA 的完整性。
6. 用 T4DNA 聚合酶"磨"出平滑末端。
7. 用 T4 连接酶添加磷酸化的 *Eco*RI 连接片段。
8. 用 *Eco*RI 从 cDNA 末端上消化掉过量的连接片段,以产生粘性的克隆繁殖末端。
9. 用丙烯酰胺凝胶按大小划分 cDNA 并进行电洗脱。
10. 为连接步骤准备 cDNA 插入物。

特殊设备

闪烁计数器

试剂

0.1mol/L 二甲基氢氧化汞 (Alfa)

700mmol/L β 巯基乙醇

1mol/L Tris-HCl, pH8.7,经高压灭菌

1mol/L KCl 经高压灭菌

0.25mol/L $MgCl_2$ 经高压灭菌

寡(dT)(12—18),1mg/ml 配于高压灭菌的水中

各为 20mmol/L 的 dGTP, dATP, dTTP 和 dCTP 的混合物,pH7.0,(也需要 2.5mmol/L 和 1mmol/L 的混合物),用高压灭菌水配制

α-^{32}p-dCTP,3 000Ci/mmol(Amersham 或 NEN)

RNAsin,30U/μl(Promega)

AMV 反转录酶,10U/μl (Seikagaku America)

0.5 和 0.25mol/L EDTA, pH8.0

放线菌素 D,400ng/ml

SS-苯酚
氯仿
4mol/L 醋酸铵
乙醇和 80% 乙醇
TE 缓冲液
2mol/L Tris-HCl,pH7.4 (也需要 10mmol/L)
1mol/L $MgCl_2$
1mol/L 硫酸铵
1mol/L KCl
10mg/ml 和5mg/ml BSA,无核酸酶(Sigma,RIA级)
RNase H, 2U/μl
DNA 聚合酶 I (5U/μl)(BM)
1mol/L Tris-HCl,pH8.0
50mmol/L EDTA,pH8.0
S-腺苷蛋氨酸,150μmol/L(P-L)
0.15mol/L $MgCl_2$
*Eco*RI 甲基化酶,20U/μl,(NEBL)
T4 DNA 聚合酶, 5U/μl(BRL)
磷酸化 *Eco*RI 连接片段 (5'GGAATTCC3'),
10 O. D./ml 溶于灭菌水中 (Collaborative-Research)
T4 连接酶,400U/μl(NEBL)
10mmol/L Tris-HCl,pH8.0

T4 连接酶缓冲液
300mmol/L Tris,pH7.4
100mmol/L $MgCl_2$
100mmol/L DTT
10mmol/L ATP

10 × *Eco*RI 缓冲液
700mmol/L Tris-HCl,pH7.4
500mmol/L NaCl
50mmol/L $MgCl_2$

*Eco*RI (NEBL)
凝胶加样缓冲液
5mol/L NaCl
5% 聚丙烯酰胺凝胶 (9-4)
TBE 缓冲液
分子量标志
酵母 tRNA, 10μg/ml

Elutip 或 Neusorb 柱

方法

实验准备

由感兴趣的组织中制备总 RNA(11-1) 并根据在寡 (dT) 纤维素柱方法 (11-3) 所叙述的方法选择性地分离聚 (A^+)RNA。经 dT 选择的 RNA 用于制备 cDNA 和构建文库。样品以1μg 聚 (A^+)RNA/μl 的浓度贮存于−70℃。

制备 cDNA

1. 将 10μl 聚 (A^+)RNA (10μg,水溶液)置于 1.5ml 微型离心管中[注释(2)]。
2. 加入 1.1μl 0.1mol/L 甲基氢氧化汞。
3. 室温放置 10 分钟。
4. 加 2μl 700mmol/L β-巯基乙醇终止甲基汞的作用[注释(3)]。室温放置 5 分钟。
5. 顺序加入下列溶液:

   5μl 1mol/LTris-HCl,pH8.7
   7μl 1mol/L KCl
   2μl 0.25mol/L $MgCl_2$
   10μl 1mg/ml 寡 (dT)(12—18)
   dGTP、dATP、dTTP、dCTP 20mmol/L, 2.5ml
   5μl-^{32}P-dCTP
   2μl RNAsin,30U/μl
   5μl 放线菌素 D, 400ng/ml
   4μl AMV 反转录酶, 10U/μl

6. 44℃ 保温 2 小时。
7. 加入5μl 0.25mol/L EDTA,pH8.0。
8. 加入 70μl SS-苯酚和氯仿的混合物(1:1)
9. 旋涡振荡。置微型离心机上离心 2 分钟分相。
10. 移出上层水相。用 70μl 氯仿抽提。重复氯仿的抽提。
11. 向水相中加 60μl 4mol/L 醋酸铵。充分混合。加 360μl 乙醇。充分混合。
12. 在干冰中冰冻 30 分钟。
13. 微型离心机中于 4℃ 下离心 10 分钟。
14. 倾出上清液。用 150μ 180% 乙醇洗涤沉淀,此时需在干冰上保持低温,但不得冻结。
15. 在微型离心机上 4℃ 下离心 2 分钟。移出上清液,真空下干燥沉淀物。
16. 将沉淀重新悬浮在 50μl TE 缓冲液中。用三氯醋酸沉淀 2μl 样品,方法如同缺口翻释(7-1)所记叙的。用液体闪烁计数器对滤纸进行计数以测定 ^{32}P-dCTP 参入到第一条链中的量。同时也测定 mRNA 复制效率。在这一操作中,5 × 10^4cpm 的 ^{32}P 参入到 2μl 的总体积中,相当于大约复制 1μg 第一链。良好的逆转录可使 5—30% 经 dT 选择的 mRNA 进行复制[即0.5—3μg cDNA/10μg 聚 (A^+)RNA]。合成的第一条

cDNA 的大小也可用聚丙烯酰胺凝胶电泳进行测定(9-4)。

17. 配制 2 × 第二链缓冲液:

8μl 2mol/L Tris-HCl, pH7.4

4μl 1mol/L $MgCl_2$

8μl 1mol/L

80μl 1mol/L KCl

4μl 无核酸酶的 BSA (10mg/ml)

13μl 各为 2.5mmol/L 的 dGTP、dATP、dTTP 和 dCTP 的混合物，中和到 pH7.0。

283μl H_2O

18. 将下列溶液合并:

50μl 第一链混合物(步骤 16)

50μl 2 × 缓冲液(步骤 17)

1.0μl RNase H(2U/μl)

2.3μl DNA 聚合酶 I (5U/μl)

19. 12℃ 保温 1 小时，接着在 22℃ 保温 1 小时。

20. 加入下列溶液:

4.0μl 0.5mol/L EDTA

100μl SS-苯酚/氯仿(1:1 混合)

充分混合，微型离心机中离心 2 分钟以分相。

21. 将上层水相转移到新的微量离心管中。加入 100μl 氯仿。充分混合。微型离心机中离心 2 分钟。

22. 重复第 21 步。

23. 向步骤 22 所获得上层水相中加入 100μl 4mol/L 醋酸铵。

24. 加入 600μl 乙醇。干冰上冰冻 30 分钟。

25. 微型离心机中 4℃ 离心 10 分钟。倾出上清。

26. 将沉淀再悬浮在 50μl 中。

27. 加入 50μl 4mol/L 醋酸铵。

28. 加入 300μl 乙醇，干冰上冰冻 30 分钟。

29. 微型离心机中 4℃ 离心 10 分钟。小心倾出上清液。

30. 向沉淀中加 150μl 80% 乙醇(置冰浴中保持低温)[注释(4)]。

31. 4℃ 下将样品离心 2 分钟，小心倾出上清液并注意切勿影响沉淀。

32. 真空下干燥沉淀。

33. 在 1.5ml 微型离心管中用 25μl 高压灭菌的水重新悬浮双链 cDNA 沉淀物。

*Eco*RI 位点的甲基化

34. 对 25μl 由步骤 33 得到的 cDNA 加入:

5μl 1mol/L Tris-HCl, pH8

5μl 50mmol/L EDTA, pH8

5μl 无核酸酶的 BSA(4mg/ml)
5μl 150μmol/L S-腺苷蛋氨酸
5μl *Eco*RI 甲基化酶 (20U/μl)

35. 37℃ 保温 20 分钟。
36. 在 65℃ 保温 10 分钟以停止酶反应。

“磨”出 cDNA 的平滑末端

37. 对 50 μl步骤 36 的反应产物加入:
    6μl dGTP、dATP、dCTP、dTTP (各 1mmol/L),中和到 pH7.0
    6μl 0.15mol/L $MgCl_2$
    3μl T4 DNA 聚合酶 (5U/μl)
38. 37℃ 保温 15 分钟。
39. 加入 8μl 0.5mol/L EDTA, pH8.0。
40. 加入 70μl SS-苯酚-氯仿(1:1)的混合物。充分混合。
41. 在微型离心机中离心 2 分钟以分相。
42. 移出上层水相并用等体积的氯仿抽提。充分混合。离心如同第 41 步。
43. 重复 42, 将上层水相移入新的管子。
44. 添加 75μl 4mol/L 醋酸铵、450μl 乙醇,在干冰上保持低温。充分混合。 干冰上冰冻 30 分钟。
45. 微型离心机上 4℃ 离心 10 分钟,倾出上清液。
46. 用 150μl 80% 乙醇洗沉淀(在干冰上保持低温)。 微型离心机内 4℃ 离心 2 分钟。
47. 小心倾出上清液。真空下干燥沉淀。
48. 将沉淀重新悬浮于 22μl 10mmol/L 的 Tris-HCl(pH8) 中。

加入 *Eco*RI 连接片段

49. 对 22μl 平端的 cDNA (由第 48 步得到)加入:

8μl 磷酸化的 *Eco*RI 连接片段(260nm 时 1ml 中的 O. D. 为10)、4 μl 10× T4 连接酶缓冲液、4μl T4 连接酶 (400U/μl)。

混合,并小心保持在 15℃ 以下,因为 T4 连接酶是热敏感的。注意: 为了驱动连接片段添加反应,此时连接片段的量大大超过 cDNA 的量。

50. 15℃ 保温过夜。65℃ 保温 15 分钟使连接酶失活。

用 *Eco*RI 消化以产生克隆繁殖所需的粘性末端

51. 对 50μl 步骤 50 所得的混合物加入
    10μl H_2O
    6μl 10 × *Eco*RI 缓冲液
    60U *Eco*RI。
52. 在 37℃ 保温 2 小时。

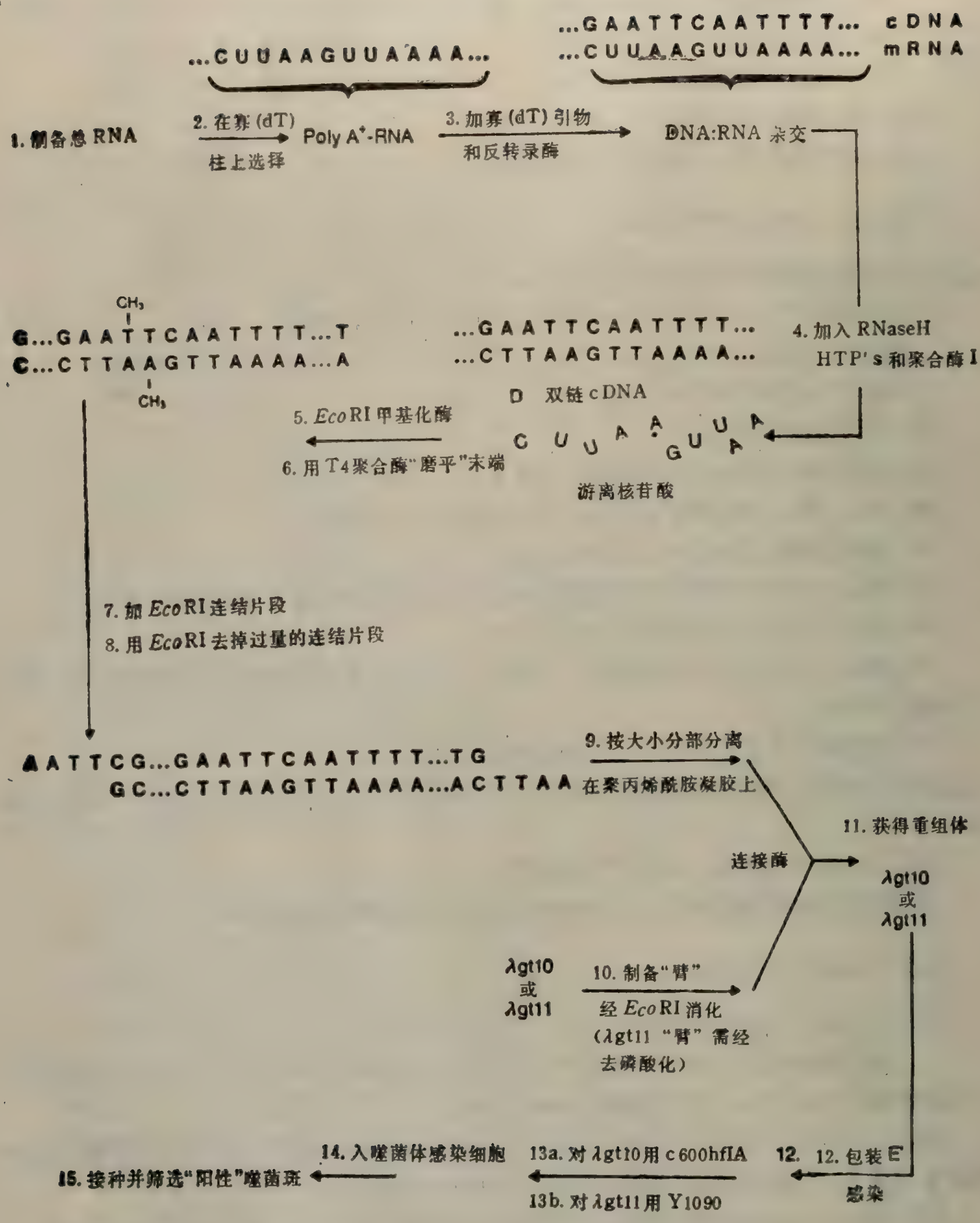


图14.1 由RNA产生双链cDNA，向cDNA上加*Eco*RI末端，以及克隆繁殖到λgt10和λgt11中去的流程示意图。

53. 加入 6μl 0.5mol/L EDTA(pH8.0)、60μl SS-苯酚和氯仿的混合物(1:1)并充分混和。

54. 在微型离心机内离心2分钟以分相。将上层水相移入新管。

55. 加入 6μl 5mol/L NaCl 和 150μl 乙醇。充分混合。

56. 在干冰上冰冻10分钟。在微型离心机内4℃离心10分钟。

57. 倾出上清液。真空下干燥沉淀。

58. 将沉淀溶于 25μl TE 缓冲液中，加 5μl 凝胶加样缓冲液。

将 cDNA 插入物按大小分部分离

59. 为了将 *Eco*RI 连接片段及不合用的 cDNA 小片段去掉，可将 cDNA 于 TBE 缓冲液(9-4)在 5%的聚丙烯酰胺凝胶上电泳，以按大小进行分部分离[注释(5)]。同时进行分子量标志的电泳。在 10V/cm 下电泳 2—3 小时后，全部超过 500bp 的 cDNA 可在凝胶上集中于一块区段上而切下(用放射自显影法并与分子量标志比较而测出)。

60. 用电洗脱程序由胶上洗下 cDNA (9-3)。将样品放在透析袋里，将两端夹紧，用 1ml 1 × TBE 缓冲液和 10μg/ml 酵母 tRNA。洗脱 12—16 小时。

61. 袋中的 cDNA 可由缓冲液中浓缩，过 Elutip-d 微型柱(10-3)。

62. 用乙醇沉淀洗脱液(20-1)。

63. 将 cDNA 以大约 2—5μg/μl 的浓度（在第一条链分析时测定）重新悬浮于 TE 缓冲液中。 cDNA 最终产量的测定是基于所合成的第一条链的比活性。cDNA 贮存于 —20℃

注释

(1) 本项技术引用 Gubler 和 Hoffman 的方法(见参考文献)。

(2) 用于制备 cDNA 的微型离心管应高压灭菌，以降低样品被 RNase 沾染的危险。当 cDNA 成为双链以后，则核酸酶作用的危险相对减少。

(3) 甲基汞有剧毒并易挥发。操作时需特别小心，并将贮存液存放在通风橱中。

(4) cDNA 用乙醇再沉淀，以去掉会干扰 *Eco*RI 甲基化酶作用的核苷酸。

(5) 对于此凝胶来说，一种方便的分子大小标志是用 *Hin*fI 和 *Eco*RI 消化后的 pBR322，用大片段的 DNA 聚合酶 I 及 ^{32}P-ATP 标记末端。为制备这样的分子大小标志，混合下列溶液：

1—2μg pBR322 DNA	10μl
10 × *Eco*RI	2μl
α-^{32}P-dATP	4μl
*Hin*fI (10u/μl)	1μl
*Eco*RI (10u/μl)	1μl
H_2O	2μl

在 37℃ 保温 60 分钟。加 1μl DNA 聚合酶 I 大片段(5u/μl)。37℃保温 15 分钟。将样品加热到65℃ 10分钟令酶失活。将此标记的样品加到 5ml G50 Sephadex 柱，并在 TE 缓冲液中进行层析，以去掉未参入的 ^{32}P-dATP。在空体积收集参入物(由柱上洗下的第一个峰)，用乙醇沉淀浓缩 (20-1)。另一个去掉未标记上的同位素的方法是将消化液用 Elutip 提纯 (10-3)。

分子量标志是：998、631、 517、506、396、344、298、221、220、154 和 75 bp。

参考文献

Gubler, U., and Hoffman, B., *Gene* **25**: 263, 1983.

Toole, J., Knopf, J., Wozney, J., Sultzman, L., Buecker, J., Pittman, D., Kaufman, R., Brown, E., Shoemaker, C., Orr, E., Amphelett, G., Foster, B., Coe, M., Knutsen, G., Fass, D., and Hewick, R., *Nature* **312**: 342, 1984.

14-3 cDNA 文库连接和包装进 λgt10 或 λgt11 臂

提要

由 14-2 制备的 cDNA 插入到由 14-1 中得到的克隆繁殖载体。必须包装载体和 cDNA。包装(噬菌体)的试剂盒有商品供应。

需要的时间

5 小时用于连接操作

3 小时用于包装操作

试剂

λgt10 或 λgt11 "臂": 0.25μg/μl 于 TE 缓冲液中(14-1)

10×连接酶缓冲液

300mmol/L Tris, pH7.4

100mmol/L DTT

100mmol/L $MgCl_2$

10 mmol/L ATP

对照插入物

*Eco*R1 消化的 pBR322: 10μg pBR322 DNA 用 *Eco*R1 完全消化。用 SS-苯酚/氯仿抽提、氯仿抽提和乙醇沉淀提纯 DNA (20-1)。用 80% 乙醇涮洗沉淀物并在真空下将沉淀干燥。在 TE 缓冲液中将 DNA 再悬浮至大约 100μg/μl 的浓度。

T4 连接酶 (NEBL)

TMG 缓冲液

包装抽提物(如 Promega Biotech 的 Packagene, Vector Cloning System 的 Gigapack)

方法

实验准备

制备拟进行插入的 cDNA (14-2)。准备 λgt10 或 λgt11 "臂"(14-1)。

连接

1. 按下页表所建议的方式将准备好的 λgt10 或 λgt11 "臂"、10×连接酶缓冲液、对照插入物、cDNA 插入物、T4 连接酶和水分别加入到 6 个管子中,每管的总体积都是 10μl。

2. 14℃ 保温 4 小时[注释(1)]。

体外包装

3. 为了构建这些文库,商品包装抽提物(即Packagene或Gigapack)很好用[注释(2)]。

	管					
	A	B	C	D	E	F
λgt10 或 λgt11	1μl	1μl	1μl	1μl	1μl	1μl
10×连接酶缓冲液	1μl	1μl	1μl	1μl	1μl	1μl
对照插入物	—	1μl	—	—	—	—
cDNA 插入物	—	—	1μl	2μl	3μl	5μl
H_2O	7μl	6μl	6μl	5μl	4μl	2μl
T4 连接酶	1μl	1μl	1μl	1μl	1μl	1μl

4. 对所有的连接管（A—F）的包装，可将管中的全部连接反应体系加到包装抽提物中去(即一个 Packagene 管)。

5. 同时，再包装另外两根管做为包装和插入的对照：

G. 0.25μg 未消化的 λgt10 或 λgt11 DNA

H. 0.25μg 经 *Eco*R1 消化，但未连接的 λgt10 或 λgt11 "臂"(相当于B管，但无 T4 DNA 连接酶)。

6. 将包装反应物于 22℃ 保温 2 小时。

7. 用 TMG 缓冲液将包装反应物稀释到 250μl。

8. 包装反应物可在 4℃ 贮存数日而滴度无明显的下降。

注释

(1) 注意要让连接混合物保持在低温，因为 T4 连接酶是温度敏感的。

(2) 如果您有意自己由大肠杆菌制备包装抽提物以代替购买的商品抽提物。可由《分子克隆：操作指南》(T. Maniatis 等编，1982)—书中查到以超声法从大肠杆菌 BHB 2690 制备提取物和以冻融法由大肠杆菌 BHB 2688 中制备裂解液的好方法。

14-4 λgt10 和 λgt11 包装插入物的接种和筛选

提要

本方法用于滴定和建立一个合适的 cDNA 文库。接种上一节中试验的连接和包装的反应混合物，以确定制备性文库形成的合适条件。

实验所需时间

几天

试剂

10 mmol/L $MgSO_4$

IPTG，100mmol/L

X gal，10%，配于 *DMF*

λgt10 的顶部琼脂

含0.8%琼脂和 10mmol/L $MgSO_4$ 的 LB 培养基

λgt11 的顶部琼脂

含 0.8% 琼脂的 LB 培养基并含下列成分:

$10mmol/L\ MgSO_4$

氨苄青霉素,$50\mu g/ml$

$100mmol/L$ *IPTG*, $3\mu l/ml$

10%*X gal*, $3\mu l/ml$

方法

实验准备

用上节所记录的方法制备 λgt10 和 λgt11的包装的文库。制备底部平板: LB 琼脂用于 λgt10,LB 加氨苄青霉素 ($50\mu g/ml$) 用于 λgt11.

接种

1. 将合适稀释度(见下文)的 λgt10 重组体接种到有大肠杆菌 c600 和 c600hfl 细胞中,这些细胞配制在 $10mmol/L\ MgSO_4$ 中。按照噬菌体接种章节(20-7)中关于接种包装反应物的方法指导,使用对 λgt10 合适的顶部与底部琼脂。37℃保温。

将合适稀释度的 λgt11 重组体接种到大肠杆菌 Y1090 细胞中,这些细胞生长在含氨苄青霉素 ($50\mu g/ml$) 的 LB 培养基中并悬浮在 $10mmol/L\ MgSO_4$ 中。按照 20-7 关于接种包装反应物的指导,使用对 λgt11 合适的顶部与底部琼脂。培养在 42℃,而不是 37℃。

对接种包装反应物时稀释程度的建议

2. a. 对于未切断的噬菌体 DNA 样品(G 管),将 14-3 所得的包装混合物用 TMG 缓冲液 1:1 000 稀释,接种 $5\mu l$ 和 $50\mu l$。

b. 对于经 *Eco*RI 切断,但未连接的对照样品 (H 管),将包装混合物用 TMG 缓冲液做 1:10 的稀释,接种 $5\mu l$ 和 $50\mu l$。

c. 对其它样品(A—F 管),将包装混合物用 TMG 缓冲液以 1:100 稀释,接种 $5\mu l$ 和 $50\mu l$。

注意:根据包装的效率,可将稀释度适当调整以使在滴定板上得到容易计出的噬菌斑数。

对 λgt10 重组体的预期结果

a. 在 c600 上,重组与非重组的噬菌体都形成噬菌斑。带有插入物 λgt10 形成透明斑 (cI^-),不带插入物的形成混浊斑。

b. 在 c600hflA 上只能见到透明斑 (cI^-),代表带有插入物的重组体。

c. 未切断的 λgt10,每 μg DNA 在 c600 上可得 10^8pfu,在 c600 hflA 上则仅有极少数的斑或完全没有噬菌斑。

d. *Eco*RI 切断但未连接的 λgt10 在大肠杆菌 c600 接种细胞上产生的噬菌斑应少于 10^6pfu/μgDNA。如果得到较多的噬菌斑,则需重复用 *Eco*RI 消化 λgt10。

e. 模式插入物系统在 c600 上每 μg 载体应产生 10^5—10^6 个透明的噬菌斑而对照为 10^6—10^7 混浊斑。在 c600hflA 上应只出现透明噬菌斑。

f. 经 *Eco*RI 切断和连接操作但无插入物（A 管)时，在 hflA 上应该没有透明斑。每微克引入的载体在 c600 上应产生 10^6—10^7 混浊斑。如果此样品出现大量透明斑的背景,则说明或是 *Eco*RI 载体克隆繁殖位点被破坏，或是载体 DNA（λgt10）被其它可经 *Eco*RI 克隆的 DNA 污染。

g. 加入 cDNA 插入物将在无插入物时的本底上刺激透明噬菌斑的产生,对 c600 的最适值是每 10 个混浊斑有一个透明斑。在 c600 hfl 上则只应见到透明斑。

3. 选择 cDNA 插入物与 λgt10 载体比例合适的管子，合适的比例是指在 c600 上有最多的透明斑数,但又不要超过每 10 个混浊斑有 1 个透明斑的上限，以降低带双份插入物克隆产生的机率。

4. 将剩余的 cDNA 再连接到与上述预实验中一样的几份反应系统中去,但仅用这种合适的比例。不要将连接反应放大,仅仅是多次重复小额的反应(参见 14-3 的步骤 1)。

5. 分别包装每份连接反应物(14-3 步骤 3—8)。用 TMG 缓冲液稀释后合并各份反应物。

6. 用连续稀释及接种法对文库做滴定，如 20-7 所叙，以测定产生的重组的克隆数。

7. 现在可将文库在 c600 hflA 上接种和筛选,每个 90mm 的板上有 5×10^3—10^4 个透明斑。用放射性标记的核酸探针筛选感兴趣的 cDNA 克隆,方法见基因组文库的筛选(13-6)。另一个方法是,在筛选前文库可以扩增,以提供此文库的许多复本用于以后的接种和筛选。为 λgt10 文库的扩增可遵循 13-7，但需用对 λgt10 合适的培养基和大肠杆菌宿主(加 10mmol/L $MgSO_4$ 的 LB，c600 hflA)。

对 λgt11 预期的结果

a. 在 Y1090 上，蓝色的噬菌斑是非重组的 λgt11。透明噬菌斑代表携带插入物的噬菌体。

b. 未切断的 λgt11（G 管)每 μg 包装的 DNA 显示 10^8 蓝色噬菌斑。

c. 经*Eco*RI 切过但未连接的 λgt11（H 管)每 μg DNA 少于 10^6 蓝色噬菌斑。如果观察到高于此数,则 *Eco*RI 的消化不合适。再用 *Eco*RI 消化和去磷酸化。

d. *Eco*RI 切过、去磷酸化并连接的不含插入物的 λgt11(A 管)，每微克 DNA 应显示少于 10^6 的蓝色噬菌斑和很少的透明斑。透明斑或是表明 *Eco*RI 克隆繁殖位点的破坏,或是 λgt11 载体“臂”制品的 DNA 污染。

e. 对照插入物(B 管)与未添加插入物的连接相比,将在透明斑的数目上表现出明显的刺激作用。大约每微克载体通常可有 10^6 透明斑。这些透明斑代表“模式插入”的 cDNA 克隆。

f. 加入 cDNA 的试管（C—F 管）应类似于模式插入物（B 管)，并刺激透明斑的数目。大多数的 λgt11 用本方法构建的文库透明斑与蓝色斑的最好比例是 1:1。

3. 选择能产生最合适的透明斑与蓝色斑比例的 cDNA 插入物/λgt11 之比（即典型时为 1:10 到 1:1)。

4. 以上面选择到的那种最适比例将剩余的 cDNA 连接到 λgt11 "臂"中。不要放大连接的规模,而可用多管的重复(14-1)。

5. 将各管反应物分别包装 (14-3 第 3—8 步)。经TMG 缓冲液稀释后合并反应物。

6. 将合并的文库以合适的稀释度接种,测定产生的 cDNA 克隆的数以对文库作滴定(方法见20-7)。

7. λgt11 文库可接种在 Y1090 上,并用抗体探针或核酸探针进行筛选。

筛选文库时的注意事项

1. 为了对 λgt10 文库进行筛选,用干燥的 LB 底层琼脂板(2 天以上)并注意观察噬菌斑的生长,以保持小的噬菌斑大小。当噬菌斑形成后(接种后 6—8 小时),而未融合前,将培养板移至 4℃ 以停止噬菌斑的生长。筛选的方法基本同 13-6,但大肠杆菌宿主要用 c600 hflA。

2. 核酸探针可先行克隆, DNA 或寡核苷酸做缺口翻译。用缺口翻译的探针进行筛选可参见 13-5 和 13-6。本书也介绍了寡核苷酸探针的使用。杂交和洗涤的条件需根据实验中所用探针的长度和性质选定(6-3 和 7-2)。

3. 用核酸探针对 λgt11 文库的筛选与对基因组文库的筛选类似(13-5 和 13-6), 但在顶层琼脂糖及底层琼脂中需含 5μg/ml 的氨苄青霉素,并用 Y1090 大肠杆菌为宿主。所有 λgt11 文库都置 42℃ 生长, 以使噬菌体阻遏物失活并有利于溶菌生长。因在筛选中颜色的选择并不重要,在顶层琼脂糖中并不需要 IPTG 和 Xgal 对基因组文库筛选的程序可由 13-6 中找到。再者,对 λgt11 文库来说,筛选的噬菌斑数目应增加, 以对文库做完全的筛选,因为在接种的噬菌体中仅一部分携带插入物。

4. 当用抗体探针筛选 λgt11 文库时要进行 NC 揭提, 因此操作程序完全不同。对此有几种方法,其中之一见下面的注释[注释(1)]。

注释

(1) 抗体探针筛选可按下法进行:

a. 将 λgt11 文库在 42℃ 保温 2—3 小时。

b. 在其上面放置编号的 NC 滤膜。使用前滤膜先浸泡在 10mmol/L IPTG 中并空气干燥。

c. 将 NC 覆盖的板在 42℃ 放 3—5 小时。

d. 将滤片排成一列并小心地移去。将板放在 4℃。

e. 将滤膜在 10mmol/L Tris, pH8,含 150mmol/L NaCl (TBS) 洗 3 次, 每次 20 分钟。

f. 滤膜在含 0.2% BSA 的 TBS 中室温下放置 1—2 小时。

g. 用滴定过的抗体(见 21-2)在含 1% BSA 的 TBS 中(每张膜 3ml)保温 1—2 小时。

h. 用含 0.05% Tween-20 的 TBS 洗 3 次,每次 20 分钟。

i. 用溶于含 1% BSA 的 TBS 的 ^{125}I-Protein A (300 000cpm/ml)保温 1—2 小时。

j. 用含 0.05% Tween-20 的 TBS 洗 4 次,每次 20 分钟。

k. 即在原来的板上进行放射自显影。

l. 拣出认定的克隆,并再进行一次接种和筛选(13-5 和 13-6)。

参考文献

Huynh, T., Young, R., and Davis, R. IN: DNA Cloning: A Practical Approach (D.Glover,ed.)IRL Press,

Oxford, 1984.
Young, R., and Davis, R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 1194, 1983.

14-5 从 λgt10 和 λgt11 cDNA 克隆中制备 DNA

提要

本方法介绍由分别生长在大肠杆菌 c600 hflA 或大肠杆菌 Y1090 中的 λgt10 或 λgt11 的 10ml 裂解液中提纯噬菌体 DNA 的方法。提纯少量的 DNA 2—5μg 用于 cDNA 克隆的初步分析。用本法制备的 cDNA 也可作为插入物的来源，用于亚克隆繁殖和在更有效的质粒宿主中进行制备规模的生长。

实验所需时间

6—8 小时

试剂

对 λgt10 cDNA 克隆：宿主细胞是大肠杆菌 c600 hfl A，培养基是含 10mmol/L $MgSO_4$ 的 LB

对 λgt11 cDNA 克隆:宿主细胞是大肠杆菌 Y1090,培养基是含 10mmol/L $MgSO_4$ 的 LB 和 50μg/ml 氨苄青霉素

氯仿

TM 缓冲液

50mmol/L Tris, pH7.4

10 mmol/L $MgSO_4$

DNase I，1mg/ml,配于 TM 缓冲液中（sigma）

5mol/L NaCl

聚乙二醇 6000（PEG-6000）

0.5 mol/L *EDTA*，pH8.0

SS-苯酚

0.3mol/L 醋酸钠，pH8.0

乙醇

TE 缓冲液

方法

实验准备

取合适的宿主细胞 2ml 培养过夜。制备新鲜接种的 cDNA 噬菌斑以供生长（20-7)。制备合适的生长培养基[注释(1)]。

生长 10ml 溶解液

1. 将宿主细胞在合适的培养基中生长到 600nm 处的 O. D. 为 0.1—0.2。 不要超

过 0.2。

2. 在一灭菌管中(如 50ml 聚丙烯螺口盖管)中将 10ml 宿主细胞与一个 cDNA 克隆的噬菌斑共同保温。用灭菌的巴斯德吸管将噬菌斑连同琼脂压出以进行转移 [12-1 注释(1)]。同时还有一份模拟感染的细菌培养物(含宿主细胞但不加噬菌体)与感染的样品同时培养。比较感染与模拟感染的样品,可容易地观察到裂解。

3. 在良好通风的条件下剧烈振荡(迴旋振荡器上振动速度超过200rpm) 培养 4—6 小时,直至确证细菌裂解(培养基变透明)。λgt10 克隆在 37℃ 振荡。λgt11 克隆在 42℃ 振荡。

4. 裂解后,加 200μl 氯仿。37℃ 振荡 2 分钟裂解残余的细菌。

5. 3 000×g 离心 10 分钟,以从样品中去掉细菌残骸,将上清液倾入新的试管。

6. 裂解液可在 4℃ 下长期贮存,而并不会明显降低滴度。典型的滴度是 $2\times10^{9}-10^{10}$。

7. 在灭菌容器中贮存 2ml 裂解液做为该克隆的贮存,加 1 滴氯仿,4℃。

由噬菌体制备 DNA

8. 剩余的 8ml 裂解液置 30ml 厚壁玻璃 (Corex) 管内,加 8ml TM 缓冲液。

9. 加 320μl DNase 1 1mg/ml, 配于 TM 缓冲液中。

10. 室温下放置 15 分钟。

11. 加 1.6ml 5mol/L NaCl 和 1.8g 固体的 PEG-600。旋迴振荡使 PEG 溶于裂解液中。冰浴 15 分钟。

12. 在水平悬挂转头上将噬菌体 10 000×g 离心 10 分钟。

13. 倾出上清液。在 300μl TM 缓冲液中重新悬浮沉淀。移入 1.5ml 微量离心管中。

14. 加 300μl 氯仿。混合。微型离心机中离心 5 分钟以分相。再次用氯仿抽提。

15. 将上层水相移入新管中。加 15μl 0.5mol/L EDTA, pH8, 30μl, 5 mol/L NaCl, 550μl *SS*-苯酚。旋涡振荡混合。

16. 微型离心机上室温下离心 2 分钟分相。

17. 将上层水相移入新管中。加 350μl 氯仿。旋涡振荡混合。微型离心机中离心 2 分钟分相。

18. 将上层水相移入一新管中,加 875μl 乙醇。

19. 置干冰上沉淀 15 分钟。4℃ 下微型离心机上离心 5 分钟。倾出上清液。

20. 将沉淀重新悬浮于 100μl 0.3mol/L 醋酸钠中, pH8。加 250μl 乙醇。在干冰上沉淀 DNA10 分钟。微型离心机上 4℃ 离心 5 分钟离下沉淀。用微量移液管小心取出上清液,但避免搅动沉淀。

21. 用 150μl 80% 乙醇再洗沉淀。4℃下微型离心机上离心 2 分钟。用微量移液管小心移出上清液,但不要搅动沉淀。

22. 真空下干燥沉淀。再悬浮于 100μl TE 缓冲液中。DNA 贮存于 −20℃。噬菌体 DNA 的产量每 10^{10}pfu/ml (最初滴度)约为 3μg。

23. 现在, cDNA 样品可用于分析插入物的大小和杂交的性质[注释(2)]。如果还要进行制备规模的生长,则可将感兴趣的 cDNA 再克隆到 pBR322 中去[注释(3)]。

注释

(1) 对用于细胞生长的试管、培养基及滴管进行灭菌。

(2) 为了进行分析，cDNA 的大小可用一份 cDNA 用 *Eco*RI 消化并用琼脂糖凝胶电泳分离插入物与克隆繁殖载体，并在电泳时同时加入分子大小标志。小量的插入物可能不易用溴乙锭显色。此时，可将凝胶印迹并用原来的探针进行杂交，以决定插入物的大小和杂交的性质（5-5、5-6、6-3、7-1、7-2)。

(3) cDNA 插入物可再克隆到经小牛小肠磷酸酶处理的、*Eco*RI 消化的 pBR322 中去，*Eco*RI 消化的cDNA 连接到质粒载体上并转化到经$CaCl_2$处理的LE392 细胞（15-2 和 15-4)。形成的克隆再用合适的探针作克隆杂交来进行筛选，以决定那些克隆含有携有 cDNA 的质粒(15-3)。制备量的 cDNA 可由这些质粒再克隆的生长而容易地得到。参看 8-2—8-4 及 15-1。还有，cDNA 插入物也可直接克隆到 *Eco*RI 消化的 M13 载体（mp8、mp9、mp11、mp18、mp19）以进行核苷酸顺序分析。

（姚志建译　沈倍奋校）

第 15 章　亚克隆繁殖到质粒中

15-1　亚克隆繁殖到质粒中的一般注意点

提要

质粒是很有用的亚克隆繁殖载体，这是因为它们易于转染入细胞和被扩增、被提纯以产生大量的 DNA。同时，插入片段插入到质粒中比从噬菌体载体得到的片段更易于用内切酶谱进行分析。但是噬菌体对产生克隆 DNA 的长片段基因文库的能力较强，也易于对阳性克隆的筛选和扩增，以便反复筛选和永久性保存。基于这些理由，一但从噬菌体 cDNA 或基因组文库鉴定出一个阳性克隆，最好将这些克隆中感兴趣的顺序亚克隆到质粒载体中，以便进一步做制备规模的增殖和进行详细的分析。

某些较早期的 cDNA 克隆繁殖的操作程序要求将由 mRNA 产生的 cDNA 先克隆到 pBR322 中以形成基因文库，在此文库中含有可通过克隆杂交被选择出的感兴趣的克隆。一个常用的程序是将 pBR322 用 *pst*I 内切酶切割，再用末端脱氧核苷酸转移酶延伸 3′-末端，以形成单链的 G 尾部。而对被克隆的 cDNA 插入物则被合成为含一互补的 C 尾部。cDNA 及克隆繁殖载体通过杂交退火，并用这样所形成的环形 DNA 来转化大肠杆菌。这些添加尾部的反应和退火进入 pBR322 及转化的过程，在本节末引用的文献(Maniatis 等，1982)中已有详尽的讨论。但是一般说来，制备长片段的 cDNA 基因文库用 λgt10 和 λgt11 要比用 pBR322 衍生的质粒更为有效。噬菌体 cDNA 文库的优点还包括可用抗体或核酸探针来筛选的便利和灵活，而且对基因文库的扩增途径也直接了当。因此，建议将质粒载体用于亚克隆和对亚克隆片段的制备规模增殖，而不是用于基因文库的构建。

本手册中的一些章节要求向质粒中亚克隆繁殖 DNA 或是分离预先克隆到质粒载体中的片段。虽然修饰过的载体，如 pBR327 也被使用，但最常引用的质粒载体是 pBR322。同时，在 lacZ 基因中含一个多聚衔接片段位点的 pUC 质粒也常使用，15-4 中将对它加以介绍。下一节介绍用于亚克隆繁殖的质粒载体的制备及与不同来源衍生来的插入片段的连接。最后在 15-3 中介绍为选择有意义的插入片段而用杂交探针筛选细菌集落的方法。

参考文献

Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach,M.C., Heynecker, H.L.,and Boyer, H.W., *Gene* 2:95, 1977.

Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York, 1982.

Sutcliffe, J.G., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 75:3737, 1978.

15-2 为插入片段的亚克隆和连接准备 pBR322 质粒

提要

本节介绍由基因组的噬菌体克隆，来自 λgt10、λgt11 cDNA 克隆的 cDNA 插入片段或由其它质粒来的片段进行亚克隆的方法。pBR322 是一种常用的质粒，本节中将它作为例子。别的质粒，如 pBR325 或 pBR327，几乎也可无需更改地沿用本方法。pBR322 衍生质粒的 pUC 家族在克隆繁殖、增殖、和筛选时有特殊的性质，将在 15-4 中讨论。

在本方法中，质粒用一种或数种 RE 切开，使成线性。在准备载体时，对限制性内切酶的选用应使其在载体中所造成的末端与准备亚克隆的插入片段的粘性和(或)平滑末端相适应。例如，一段 *Eco*RI-*Bam*HI 片段准备亚克隆，则载体应该用 *Eco*RI 和 *Bam*HI 消化，以使在连接时能有效地形成重组体。某些限制性内切酶可产生在连接时能与另外的限制性内切酶末端相匹配的粘性末端。

例如，限制性核酸内切酶 *Sau*3A 产生这样的末端：

▼
| G A T C
C T A G |
▲

它能连接到 *Bam*HI 位点

▼
G | G A T C C
C C T A G | G
▲

任何一种平滑末端可与其它的平滑末端相连接。

例如，*Pvu* II 末端

▼
C A G | C T G
G T C | G A C
▲

可连接到 *Sma* I 末端

▼
C C C | G G G
G G G | C C C
▲

注意由两个不同的限制性内切酶末端的连接，经常不能再产生对这一种或两种内切酶的识别位点。而任何限制性内切酶产生的末端与由同一种内切酶产生的末端相连接，则当然[illegible]后能再形成这个限制性内切酶的识别位点。在进行亚克隆实验以前，必须先确证载体一插入片段限制性内切酶末端的相容性。内切酶消化的载体必须含有完整的药物抗性基因(如氨苄青霉素或四环素)和 DNA 复制起点，这两者使被带有重组体质粒所转

化的大肠杆菌能得以被选择，还能让质粒 DNA 环在大肠杆菌宿主中进行自主地复制。

当对在其两个末端上带有相同的内切酶末端的片段进行亚克隆时（对称克隆繁殖），可用碱性磷酸酶从线性化的质粒载体上移去5′-磷酸盐。这可抑制质粒载体的相容的末端被此之间再连接，从而提高与插入片段末端连接及形成携带插入片段克隆的效率。质粒制备后，被克隆的片段与制备好的载体互相连接。此连接混合物转化进大肠杆菌，并靠质粒上的药物基因筛选转化体。

所需时间

1天

特殊设备

细菌细胞培养装置

试剂

克隆到噬菌体或其它质粒（如 EMBL3、Charon 28、λgt10 或 λgt11）中的 DNA 插入片段

接受插入片段的 pBR322 质粒或其它相似的亚克隆载体

限制性内切酶，如 *Eco*Rl

10×限制性内切酶缓冲液(5-4)

SS-苯酚

氯仿

乙醇

TE 缓冲液

10×连接酶缓冲液

T4 DNA 连接酶，100U/μl（NEBL）

冰冻干燥的小牛小肠碱性磷酸酶(LCIP)(BM)，0.3U/μl（如14-1所述）

10×碱性磷酸盐缓冲液

　0.5mol/L Tris，pH9.0

　10mmol/L $MgCl_2$

　1mmol/L $ZnCl_2$

方法

质粒和插入片段的连接

连接操作根据插入 DNA 的来源而改变。如果 DNA 来自有相同的限制性内切酶末端的噬菌体，使用方法 A。如果限制性内切酶末端不同，DNA 片段末端是非对称的，应用方法 B。如果插入物是来自 λgt10 或 λgt11 的 cDNA，则用方法 C。

用于对称性亚克隆繁殖的线性化、去磷酸化的 pBR322 的制备

1. 在 1.5ml 微型离心管中，按5-4中的方法，用选定的限制性内切酶切割 5μg

pBR322，总体积 20μl，60 分钟，37℃[注释(1)]。

2. 向管中加入：

10×碱性磷酸酶缓冲液	5μl
H_2O	24μl
碱性磷酸酶	1μl

3. 稍稍离心，使全部液体积于管底。37℃ 保温 30 分钟。

4. 按20-1的方法，SS-苯酚/氯仿抽提 DNA，乙醇沉淀。

5. 将 DNA 沉淀物重新悬浮在 50μl TE 缓冲液中，分成小份保存于 −20℃。

方法 A：对称性克隆繁殖

6. 基因组 DNA 片段，用限制性内切酶切割，从噬菌体分离，在微型胶上(9-1)用溴乙锭显示。电泳后，将这些感兴趣的内切酶片段用电洗脱(9-3)分离。插入物及制备好的 pBR322 质粒用同样的限制性内切酶切割，如 *Eco*R1，以备连接[注释(2)]。

7. 同时加入：

0.3μg 切割好的插入物(第 6 步)	2μl
0.1μg 准备好的 pBR322 (由第 5 步得到)[注释(3)]	1μl
T4 DNA 连接酶	1μl
10×连接酶反应缓冲液	2μl
H_2O	14μl

8. 14℃ 保温 4 小时或过夜。

9. 连接了的插入物已准备好，以供细菌的转化(8-1)及随后的菌落筛选(15-3)或微型制备分析(8-4)，以鉴定带有选定的插入物的克隆。

方法 B：非对称性克隆繁殖

10. 如用不同的内切酶制备插入物时，则出现不对称的末端。用选定的两种限制性内切酶消化 DNA 片段。在琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶上(9-2 或 9-4)对内切酶消化后的插入物电泳，再用电洗脱分离出插入物片段(9-3)。

11. 制备 5μg pBR322，用相匹配的限制性内切酶切割 (5-4)。用 20-1 中的方法以 SS-苯酚-氯仿抽提使内切酶失活，乙醇沉淀。将提纯的 DNA 沉淀再悬浮于 20μl TE 缓冲液中。

12. 在琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶上分离选定的质粒载体片段(9-2 或 9-4)。电洗脱合适的片段(9-3)。提纯的载体以 0.1μg/μl 的浓度在 TE 缓冲液中再悬浮。

13 在 1.5ml 微型离心管中同时加入：

0.4μg DNA 插入物(第 10 步)	2μl
0.1μg 质粒 DNA (第 12 步)	1μl
10×连接缓冲液	2μl
T4 DNA 连接酶	1μl
H_2O	14μl

14. 14℃ 保温 4 小时或过夜。

15. 连接的插入物已准备好，以供细菌的转化(8-1)及接下来的菌落筛选(15-3)或微型制备分析(8-4)，以鉴定具有选定的插入物的克隆。

方法 C：插入物的亚克隆繁殖——鸟枪法[注释(4)]

16. 因为来自噬菌体 cDNA 文库的插入片段可能是小的，可能难于在凝胶上用溴乙锭染出和被分离。对它们的存在和大小通常是用 Southern 印迹法和用感兴趣克隆制成的放射性探针杂交，接着行放射性自显影来测定。存在于凝胶上的 cDNA 插入物的量可能对一般的制备亚克隆片段的方法来说是太少了。推荐使用下面的方法。

17. 用 *EcoRI* 消化 0.5—1μg 含插入物的 λgt10 或 λgt11，反应总体积 40μl (5-4)。

18. 保温后，将限制性内切酶反应液加热到 70℃ 5 分钟。向 40μl 热灭活的消化液中加入：

10×连接反应缓冲液

T4 DNA 连接酶

按方法 A 所制备的、经 *EcoRI* 消化和去磷酸化的 pBR322 (0.1μg/μl)(第 5 步)

H_2O

19. 14℃ 保温 4 小时或过夜。

20. 大的完整的 λgt10 或 λgt11 不能被质粒接受做连接，又由于碱性磷酸酶的处理，pBR322 也不会自行成环。在这样的条件下，cDNA 插入物可有效地连接到载体中。

21. 将连接反应的全部反应体积 (50μl) 按 8-1 中的方法做转化，接着用探针做菌落杂交以选择含插入物的克隆，如 15-3 所述。

注释

(1) 在进行碱性酶反应以前，取 1 小份在微型胶上电泳，以确证载体 DNA 已被完全消化。载体不完全的消化将造成高的、不含插入物克隆的本底。

(2) 插入物与质粒的摩尔比大约应为 4:1。

(3) 见注释(2)。

(4) 一种相似的"鸟枪"技术可用于由 λ 噬菌体 DNA 插入片段的亚克隆，而不需要制备纯的片段。噬菌体 DNA (0.5—1μg) 用限制性内切酶消化并连接到大约 0.1μg 的内切酶切过的载体上。选用一种限制性内切酶，使产生的片段短于 10kb，以便有效地向 pBR322 中克隆繁殖。连接混合物用于转化合适的细菌细胞 (8-1)。通过对各个转化菌落的微制备分析或菌落杂交法(15-3)选择感兴趣的亚克隆(15-3)。

15-3 pBR322 菌落杂交

提要

本方法是用放射性探针与含质粒的细菌菌落杂交，以选择出带有选定插入物质粒的菌落。菌落部分地由 LB 抗生素板转移到NC滤膜上。在NC 滤膜上的菌落被裂解，变性的DNA 贴在滤膜上。用 7-2 所介绍的方法与探针的杂交。选出的菌落然后在选择性培

养基中生长，制备质粒 DNA 以供进一步分析。

所需时间

杂交前需 4 个小时
杂交过夜
第二天 2 个小时

特殊设备

真空烤箱
塑料袋封口器
放射自显影装置

试剂

LB 氨苄青霉素或 LB 四环素平板(20-6)
NC 滤膜
0.5mol/L NaOH
1.5mol/L NaCl，配于 **0.5 mol/L Tris**(pH7.4) 中
1.5mol/L NaCl 配于 2×SSC
根据所用的探针，选用杂交缓冲液N或 S

方法

实验准备

将感兴趣的 DNA 克隆到 pBR322 中(15-2)。转染和接种含质粒的菌落，如 8-1 所述。在一块新的 LB 抗菌素板上，用无菌的牙签将各个菌落放在一个个的方格中。将此方格平板培养 8—16 小时以使菌落重新形成。

准备一个缺口翻释的限制性片段探针以与感兴趣的 DNA 杂交(6-1 或 7-1)。也可用合成的探针[注释(1)]。用 T4 多聚核苷酸激酶标记合成的探针，如 6-2 所述。

转移到硝酸纤维素膜上

1. 将一个圆形的干NC滤膜放在含有待筛选菌落的方格平板上[注释(2)，(3)]。先将一侧放下，再将膜均匀地铺在平板上。

2. 用一个注射器的针头沿滤膜的边以不对称的方式打孔做为标志。用记号笔于平板的底部在针孔的位置做上记号。这些对以后的定位是有用的。

3. 俟 NC 膜完全湿透后(约 1—2 分钟)，用两把平头的镊子在膜的两边滤膜垂下处夹起从而将滤膜从板上揭下。每一个菌落都会有一部分粘在 NC 膜上，并仍会有一小部分留在琼脂板上。

4. 将培养板在 37℃ 再保温 4—6 小时，使菌落重新形成。将培养板贮存于 4℃，直至通过杂交鉴定出阳性菌落。

滤膜的准备

5. 将揭下来的 NC 滤膜放在一片用 0.5mol/L NaOH 饱和的 Whatman 3MM 滤纸上，菌落面向上，标号面向下。

6. 令 NC 膜完全湿透(5 分钟)。

7. 移开滤膜，简单地放在擦手纸上，以吸掉过多的液体。

8. 将滤膜转移到另外一张浸泡在含 1.5mol/L NaCl 的 Tris (pH7.4) 的 3MM 纸上，菌落面向上，在室温中放置 5 分钟。将滤膜从纸上移下，放在一张清洁的擦手纸上，吸去过量的缓冲液。

9. 将滤膜移到第三张浸泡有含 1.5mol/L NaCl 和 2×SSC 的 3MM 纸上。放置 5 分钟。从纸上移开滤膜。在清洁的擦手纸上吸去多余的液体。

10. 在实验台上空气干燥滤膜 1 小时。真空下 80℃ 烘 2 小时。

11. 滤膜现已准备好与放射性探针杂交。如果用合成探针，按 6-3 的方法继续进行。如果用缺口翻译探针，则按 7-2 进行。

12. 用 20-5 的方法将杂交后的 NC 滤膜做放射自显影。将放射自显影谱与培养板按打下的记号定位、排好。鉴定阳性的杂交菌落并用微制备分析(8-4)或制备性质粒生长(8-2或8-8)让所要的菌落增殖。

注释

(1) 由于与贴在 NC 滤膜上的蛋白质非特异性粘连，合成的探针可能难于应用。如换用 Colony/Plague Screen (NEN) 膜，并在杂交缓冲液中包括 0.1% SDS 和洗涤，可能会在一定移度上降低本底。注意，此滤膜不得烘烤。

(2) 用铅笔或钢笔给 NC 滤膜编上和培养板相应的号。将滤膜放在板上，编号的一侧向上。

(3) 在筛选中，放入已知不含有感兴趣的插入物（如不带克隆的插入物的 pBR322)的菌落做为筛选中的阴性对照，以区分非特异性杂交和特异性的与探针的结合。

15-4 亚克隆到pUC质粒中

提要

代替克隆繁殖 DNA 到 pBR322 中去的另一个方法是用 pUC 质粒。这是一种改良的 pBR322 载体，它带有氨苄青霉素抗性基因和相似于 M13 mp 载体的多聚衔接区[注释(1)]。在pUC质粒中还包括 lac Z基因的 5′ 末端，它可由于克隆片段嵌入到多聚衔接区而隔断，使得对于携有插入物的片段有一种颜色选择。携有插入物的质粒不能补充 α-互补性大肠杆菌宿主的 gal^- 表型。它们形成的转化体仍保留 gal^-，因此不能将 Xgal 代谢成蓝色色素。这样形成的生长在加有 IPTG 和 Xgal 的 LB-氨苄青霉素板上的菌落仍应保持白色，反之，不携带插入物的质粒可补充大肠杆菌宿主，使其成为 gal^+，并在加有 IPTG 和 Xgal 的 LB-氨苄青霉素板上形成蓝色集落。因为在 pUC 载体的多聚衔接区有一系列克隆繁殖位点存在，pUC 经常是比 pBR322 更通用的亚克隆繁殖载体。

在 pUC 所用的连接和转化方法与用于 M13 亚克隆繁殖(16-2和16-4)和 pBR322

亚克隆繁殖(15-2 和 8-1)的方法类似。

插入物克隆繁殖到 pUC 中

DNA 片段的制备和连接和 15-2 用于 pBR322 的方法一样。注意如第 4 章的图所示,可利用的克隆繁殖的位点是不同的。为了利用 pUC 的颜色选择性质,将质粒在大肠杆菌宿主(如 JM103)转化和增殖。将 $CaCl_2$ 转化体接种在含 Xgal、IPTG 和氨苄青霉素的 LB-氨苄青霉素的板上,用 20-6 介绍的方法制板。

质粒的生长

质粒生长条件与用于 pBR322 的一致 (8-1—8-4)。因为 pUC 没有四环素抗性基因,仅氨苄青霉素能用于选择。而且,DNA 插入物可连接到多聚衔接区。

对克隆到 pUC 中的 DNA 顺序分析

尽管不大常用,但 pUC 仍可用于部分顺序分析,所用的操作类似于 M13 顺序分析的方法(16-10)。由 pUC 质粒做顺序分析的方法在下面介绍。

试剂

TE 缓冲液
SS-苯酚
氯仿
乙醇
限制性内切酶
限制性内切酶缓冲液(15-4)
通用性启动子 (17-mer, Collaborative Research), 用水稀释到 250μl, 贮存于 −20℃
10×聚合酶反应缓冲液,贮存于−20℃。参看 16-10 有关顺序分析的试剂

方法

1. 用切点在插入物和启动子之外但在多聚衔接区以内的限制性内切酶 (5-4) 切割 pUC 质粒 10μg (参见第 4 章中 pUC 质粒限制性内切酶谱)。
2. 进行 *SS*-苯酚/氯仿抽提和乙醇沉淀(参见 20-1)。
3. 再将沉淀物溶解在 20μl TE 中。
4. 合并 1μg (2μl) 内切酶切割的质粒和摩尔比超过 10 倍的通用型启动子、1.5μl 10×聚合酶反应缓冲液,并加水至最终体积 9.5μl。
5. 95℃ 加热 2 分钟。再立即放到冰上至少 5 分钟,使启动子退火并使双链的形成最少[注释(2)]。
6. 转入 16-10 的第 2 步。
7. 这种部分顺序的信息对确证已经得到的感兴趣的质粒时是有用的。

注释

（1）在 pUC 家族中有许多成员。一般说来，较大的号(如 pUC18 对 pUC8)表示在其唯一的克隆繁殖区有较多的 RE 位点。很多对 pUC 质粒,例如 pUC18 和 19 或 8 和 9，区别仅在于克隆繁殖区中从左到右的 RE 位点方向不同,相似于 M13 的情况(16-1)。

（2）这也可用碱（0.5mol/LNaOH）处理来实现。参见 Zagursky 等的参考文献。

参考文献

Ruther, U., and Muller-Hill, B., *EMBO J.* 2:1791, 1982.

Zagursky, R., Baumeister, K., Lomax, N., and Berman, M., *Gene Anal. Tech.* 2:89, 1985.

（姚志建译　沈倍奋校）

第 16 章　M13 克隆繁殖和顺序分析

16-1　M13 克隆繁殖和顺序分析：概要

提要

本书下面的 10 节介绍一组重要的分子生物学技术：将 M13 载体用于 DNA 的克隆繁殖和顺序分析。本节对 M13 载体和双脱氧顺序分析技术做一般性的描述。

已发展了一些细菌菌株，它们被分子生物学家用于制备 M13mp 克隆。这些菌株中有 3 株在本节概述的方法中特别有用；对 mp 克隆，JM103 是常用的细菌宿主。许多实验室已用这个宿主成功地产生了大量的对 S1 酶分析和 DNA 顺序分析有用的 M13 亚克隆。这个菌株生长良好，转化效率高，在大多数实验里可从几毫升培养液得到合意的 DNA 产量。但是，这个菌株含有两个活化的限制性修饰系统 *Eco* K12 和 *Eco* P1 系统，这和最初发表的它应当是缺乏限制性系统的基因型的观点相反。这两个限制性系统对克隆含有大量 *Eco* K12 识别位点(AGACC)或 *Eco* P1 限制位点($AACN_6$ GTGC)的未修饰的 DNA 可能产生困难。

已构建了试图克服 JM103 的局限性的两种新的菌株。大肠杆菌 JM107 菌株可成功地用于生长 M13mp 噬菌体。这个细胞系丢失了 *Eco* K12 和 *Eco* P1 的限制系统。JM107 比 JM103 生长得慢，而且从制备性生长中得到的 M13 DNA 产量比从 JM103 得到的要低。JM109 与 JM107 相同，但是它是 $recA^-$，这就降低了同源重组率和克隆顺序的缺失。当一个大的插入片段被亚克隆时，JM107 和 JM109 比 JM103 的优势在理论上应当更有意义，而且对含有许多个 *Eco* P1 或 *Eco* K12 识别位点的片段插入机率高。所有这些菌株都可用于下几节所记述的方法中。根据所遇到的特定的亚克隆的问题，某一特定的宿主可能最有用。

对 M13 载体的描述

已构建了大量的克隆繁殖载体并可以买到。M13 载体 mp8、mp9、mp10、mp11、mp18 和mp19 是环状单链 DNA，呈纤维状，是雄性特异的大肠杆菌噬菌体。它们已被改造成包括一个多聚衔接区、带有多种限制性酶切位点、能快速进行克隆繁殖，而且插入了 β-半乳糖苷酶基因 (lacZ) 的载体。因为 lacZ 基因被隔断，所以含有插入片段的 M13 噬菌体是 gal^-。当它们生长在适宜的 α-互补性的 gal^- 大肠杆菌宿主(例如 JM103 或 JM107)中并有 Xgal 存在时，形成无色噬菌斑。非重组 M13 噬菌体用于这些实验时能对大肠杆菌宿主的 gal^- 产生互补作用，从而形成蓝色噬菌斑，这就使它们与重组噬菌体所形成的透明噬菌斑很容易地区分开来。

多聚衔接区域的多个限制性内切酶位点可允许多种限制性片段被克隆进 M13 载体。各种 mp 载体在它们的多聚衔接区域含有不同的限制性内切酶位点，通常 mp 的编

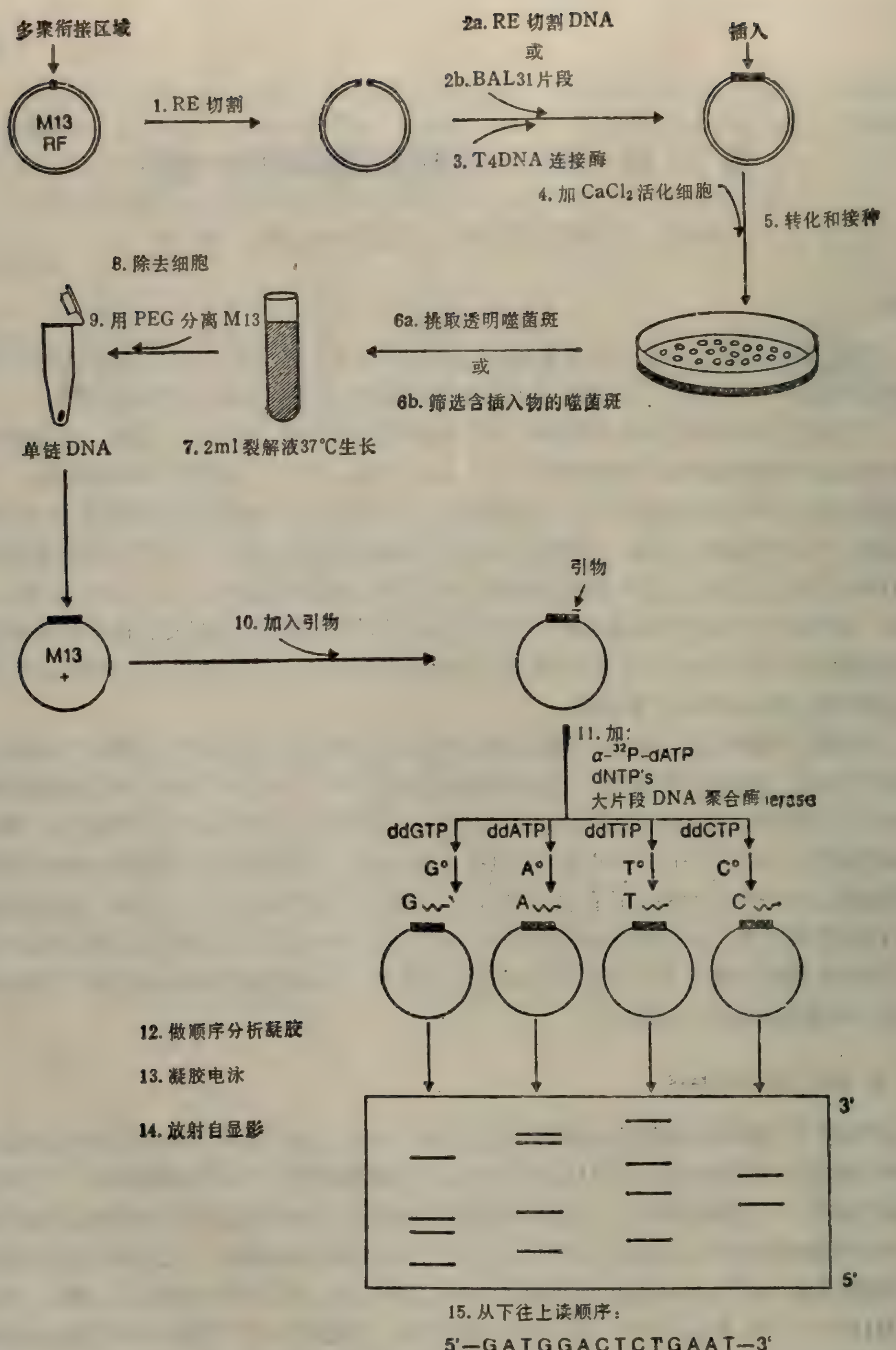
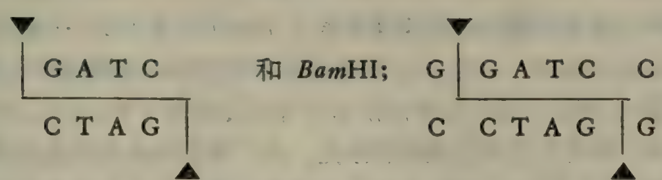


图 16.1 M13 双脱氧链终止法做顺序分析的示意图。DNA 克隆到 M13 的双链 RF 型中，用此带有插入物的载体转化细胞，分离出带有插入物的单链 M13。将这样的单链做模板，在大片段DNA聚合酶的作用下进行引物延伸反应。在各个反应中包括特定的 ddNTP 使链终止。从统计机率来看，这将造成在引物以后的每一个有此特定核苷酸的位置都可能终止。有此得到的不同长度的产物可在顺序分析凝胶上分离，胶的放射自显影图将通过(分别代表每一种核苷酸的) 4 行中每一行内谱带的位置(由 ddNTP 终止)表示出顺序。

号越大,其克隆位点也就越多。而且,在多聚衔接区域的内切酶位点的顺序在某几对 mp 载体中的方向正好颠倒,例如 mp8 与 mp9、mp10 与 mp11 或 mp18 与 mp19。这种配对允许带有不对称末端的片段在两个方向上进行克隆繁殖(例如利用 mp18 和 mp19 两个载体对 *Eco*RI 和 *Hind*III 片段在两个方向上克隆)。这就能够使限制性片段的一股链在 mp18 上克隆繁殖和顺序测定,而它的互补链则在 mp19 上进行。紧接着多聚衔接区的是能专一地与合成的寡核苷酸引物退火的顺序。于是用大片段 DNA 聚合酶 I 在使引物延伸时,可容许被克隆的插入物作为模板。

为将限制性内切酶片段克隆进mp载体,必须在多聚衔接区产生能为准备连接进来的片段末端相匹配的末端。例如,任何平末端(即不产生凹陷也不产生突出的单链部分的限制性内切酶切割位点)能被直接连到任何其它的平末端上。带有粘末端的限制性内切酶切割位点(凹陷或突出)必须与其连接对象的碱基配对,按这样的方式进行,即一个位点的 3′ OH 与另一位点的 5′ 磷酸基正好对齐。任何限制性内切酶位点能连到另一个用同样的内切酶产生的切割末端上,因此总是可以做匹配连接。有几对不同的限制性内切酶也能产生相匹配的末端;现以 *Mbo*I 为例:



为了制备 M13 克隆繁殖载体必须制备双链的 M13 复制型(RF),因为只有双链 DNA 才能被限制性内切酶切割。为将 M13 载体用做克隆繁殖载体和顺序分析,所要做的处理、贮存、增殖和操作的许多概念将在下面的各节中介绍。

DNA 片段的顺序分析

为增加对某种基因结构的了解,一种重要的技术就是快速、精确的DNA顺序分析。为克隆的、末端标记的DNA片段做快速顺序分析,发展的第一个方法涉及到对特定核苷酸的化学修饰和切断,随后再通过在高分辨的变性丙烯酰胺凝胶上的电泳。这种化学顺序分析方法是 Maxam 和 Gilbert 1977 年发展的。这个方法在本节参考文献的头两篇文献中有详细的描述,本书不再重复。

另一种快速的 DNA 顺序测定方法,即用 M13 载体的双脱氧顺序分析法,将在下一节中介绍。在用 M13 克隆做顺序分析时有 3 个步骤:克隆的产生,待顺序分析的克隆的筛选,以及用于推断延伸链中碱基顺序的引物延伸顺序分析过程本身。有 3 种技术可产生待顺序分析克隆。如果有被克隆区域的详细限制图谱,那么能制备特定的限制性片段并直接连进M13 载体以克隆繁殖感兴趣的片段(16-2)。如果对待顺序分析区有探针可供选择,则含有此待顺序分析区的实质性限制性消化产物可用"鸟枪"法去克隆,从而产生一个小的基因文库,其中的一部分会包含有感兴趣的片段。然后这些克隆可用探针做杂交而被选择出来以进行详细序列的分析(16-6)。最后,产生克隆的最全面和系统的方法是连续的 BAL31 外切核酸酶缺失法。在这一方法中产生了一系列重叠的克隆,它们的区别在于经 BAL31 核酸外切酶从待顺序分析区的一端进行消化所造成的不同程度的

缺失。这些连续缺失的克隆允许通过渐进地分析缺失更多的克隆的顺序，从而测定出整个区域的顺序。这一方法能用于对所感兴趣的区域的限制性位点图谱几乎毫无重要信息的场合下。

存在两种选择待顺序分析克隆的方法。第一种方法涉及到应用针对待分析区域的特异性探针，以通过杂交技术来筛选 M13 克隆(16-6)。然后可用对由被选出的克隆所制备的 DNA 进行单行的顺序分析以鉴定出精确复制的或同胞的克隆(16-8)。当进行完整顺序的分析时，单行顺序分析也用于从一组同胞顺序中预指出那些 DNA 将会给出最清楚的顺序。

一旦克隆已产生并被筛选出来，就进行引物延伸以测定插入物的顺序。一种合成的寡核苷酸（17-mer）引物被退火到直接靠近克隆插入物单链 M13 DNA 基因组上。采用大片段DNA 聚合酶 I 的 4 种单独的引物延伸反应随即开始。每种反应含所有 4 种脱氧三磷酸核苷酸(dNTP)，但其中一种 dNTP 用 ^{32}P 或 ^{35}S 标记，这是为以后用放射自显影检测延长的链。4 种反应的每一种都加入一种低浓度的双脱氧核苷三磷酸（dd GTP、ddATP、ddTTP、ddCTP)。于是，每管中大量的引物延伸反应同时发生，但是在延伸反应的任一点上都有一小部分新延伸链的末端将参入 ddNTP。管中这一小部分反应，由于其 3′ OH 端是缺失的而不能进一步延长。但是其它延长反应将继续进行，直到 ddNTP 被参入。在这 4 支管中，将存在这个顺序的所有可能长度的混合物，所以，它们全由引物区开始，但停止在某一种特定的双脱氧核苷酸处。由于标记的核苷酸延着其全长在多处被插入，所以这些片段都具有放射活性。当来自 4 支管的样品在高分辨序列胶的毗邻孔中走电泳时，从几个核苷酸长一直到用引物延伸法完成的最大长度的每个片段都将显示为独立的谱带。最短的片段在凝胶上将走到最下面。

因此，例如在含有 dNTP 和 ddGTP 的G管中，将只出现那些以G为结尾的延伸序列，但是管中将会有所有的各种长度的以 G 为末端的延伸 DNA。所以，如果在插入到 M13 载体上的 DNA 模板上的引物(位置 1)后第 15、17、21 和 28 位有C核苷酸存在，则在G管中就将有在 15、17、21 和 28 位上被双脱氧核苷酸中止的片段。而且如果模板DNA上含有一段 6 个核苷酸的顺序 5′-ATTGCG-3′，则新合成的引物延伸的 DNA 片段将携有一段与此逆行互补的顺序 5′-CGCAAT-3′。在顺序分析凝胶的放射自显影上，从下往上读则将有一个C信号，一个G信号，一个C信号，2个A信号和一个T信号。

本方法快速、精确简单，比化学顺序分析法所需的工作量要少。而且用双脱氧顺序分析法时放射活性物质使用量少、所用的化学试剂危险性也较小。凝胶的放射自显影 1—2天后就能读出，这就能够快速收集到顺序的分析的资料。虽然从任一组反应一般仅能读出 200—400 个碱基，但有用本方法进行拼合的技术，可应用于大得多的 DNA 片段。

为顺序分析的目的而产生的 M13 亚克隆也能用在其它基因表达的研究中，例如用于 Northern 印迹法或 S1 核酸酶定位法。由于上述原因，本书将 M13 克隆繁殖和双脱氧顺序分析法作为一种对大多数顺序分析研究都可供选用的方法介绍给读者。

结论

在这些技术中有 3 个主要步骤：M13 重组克隆的产生，待顺序分析克隆的选择和引物延伸反应/双脱氧顺序分析。所有这些步骤将在以下的 9 节中加以叙述。

参考文献

Maxam, A., and Gilbert, W., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **74**: 560, 1977.
Maxam, A., and Gilbert, W., Meth. Enzymol.65: 499, 1980
Messing, J., *Meth. Enzymol.* **101**: 20, 1983.
M13 Cloning/Dideoxy Sequencing Instruction Manual, Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, Md., 1980.
Sanger, F., and Coulson, A., *J. Mol. Biol.* **94**: 441, 1975.
Sanger, F., Nicklen,S., and Coulson, A., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **74**: 5463, 1977.

16-2 制备在特定限制性酶切位点克隆繁殖的插入物

提要

本节记述克隆繁殖 M13 载体中的 DNA 限制性片段的制备方法。DNA 片段可能具有可与M13 多聚衔接区上的任何结合部位能相匹配连接的粘性末端。任何平末端却可被连接到 mp8、mp9、mp10、mp11、mp18 或 mp19 载体中的两个平末端克隆繁殖位点 *SmaI* 位点和 *HincII* 位点中的一个上。如果需要，克隆繁殖插入片段也可通过连续 BAL31 外切酶缺失法做进一步的制备(参见16-3)。

实验所需时间

1天

特殊设备

真空离心机
微型凝胶装置
电洗脱装置
闪烁计数器(必要时用)

试剂

用于 M13 插入的限制性内切酶,它取决于所用的 mp 载体和待插入的 DNA 片段的性质。

10×RE 缓冲液(取决于使用的 RE,参见 5-4)
SS-苯酚
氯仿
TE 缓冲液
3mol/L 醋酸钠，pH7.4
10×聚合酶缓冲液
DNA 聚合酶 I,大片段 (Klenow) 5U/μl
酵母 *tRNA*，10mg/ml
10mmol/L DTT
0.5mmol/L dATP、dTTP、dCTP 和 dGTP 的混合溶液，pH7.0

T4 DNA 聚合酶5U/μl(BRL)

10 × T4 聚合酶缓冲液

700mmol/L Tris, pH7.4

100mmol/L $MgCl_2$

50mmol/L DTT

方法

实验准备

制备含待顺序分析区的质粒或噬菌体 DNA。弄清此区域附近的限制性酶切位点的分布，为进行 M13 克隆繁殖和顺序分析确定合适的片段。合适的限制性酶切位点是在感兴趣区域的 100—300 碱基处[注释(1)]。

待顺序分析的 DNA 片段有和 M13 克隆繁殖位点相匹配的 RE 位点时

1. 用 RE 消化 5—10μg 克隆 DNA,以得到想要的片段(5-4)。如果要用的 RE 不止一个,那么对每一种 RE 的盐的条件必须相容。如果盐的条件不一样，那么从所需盐浓度最低的一种 RE 开始,依次使用之。

2. 样品在琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶上走电泳以分离感兴趣的片段(9-1)[注释(2)]。在紫外灯下,通过溴乙锭显示出样品。

3. 从凝胶上挖出所要的带。从凝胶条上电洗脱 DNA(9-3)。加 1μl 的酵母 tRNA 洗脱样品。

4. 用 SS-苯酚/氯仿抽提样品,用乙醇沉淀(20-1)。

5. 真空离心干燥样品。将样品以 0.1μg/μl 的浓度重新悬浮在 TE 缓冲液中。用于连接的 DNA 限制性片段现在已备好待用(16-4)。

当 DNA 末端与 M13 克隆繁殖位点不相匹配时

可通过大片段 DNA 多聚酶 I (对 5′ 凸出末端)或 T4 DNA 多聚酶 (对 3′ 凸出末端)将不相容的末端转变成平末端 [注释(3)]。注意无论 5′ 凸出或 3′ 凸出的末端都可造成,只取决于用哪种限制性内切酶。用第3—5步在 5′凸出时产生平末端,而用第 6—8 步在 3′ 凸出时产生平末端。

1. 用一种其末端将转变成光滑形式的内切酶完全消化 20μg 的克隆 DNA。用 SS-苯酚/氯仿抽提以除去 RE,乙醇沉淀(20-1)。

2. 重新悬浮纯化的 DNA 于 20μl 的 TE 缓冲液中。

对于 5′ 凸出的末端

3. 混合:

DNA 样品	20μl
10×聚合酶缓冲液	3μl
10mmol/L DTT	3μl
dNTP 混合液(每种 0.5mmol/L)	3μl

DNA 聚合酶 I (大片段)　　1μl

4. 37℃ 保温 15 分钟。

5. 70℃ 加热 10 分钟灭活酶。以下进入步骤 9。

对于 3′ 凸出末端

6. 混合：

DNA 样品	20μl
10 × T4 聚合酶缓冲液	3μl
dNTP 混合液(每种 0.5mmol/L)	3μl
H_2O	3μl
T4 聚合酶	1μl

7. 37℃ 保温 15 分钟。

8. 70℃ 加热 10 分钟灭活酶。

9. 通过 SS-苯酚/氯仿抽提及乙醇沉淀纯化 DNA (20-1)。DNA 沉淀重新悬浮到 20μl 的 TE 缓冲液中。

10. 不相容的 5′ 凸出或 3′ 凸出末端现在已成为平滑的了，可和 M13 mp 载体多聚衔接区的 *Sma*I 或 *Hin*cII RE 位点相匹配而连接。

11. 如有必要，来自步骤 9 的 DNA 可再用一种 RE 消化，以产生为克隆繁殖到 mp 载体中去的不对称片段(5-4)。RE消化之后，按照 20-1 的方法通过抽提和沉淀纯化DNA，并将沉淀再悬浮于 20μl 的 TE 缓冲液中。

12. 通过琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶(参见 9-2—9-4)的分辨及电洗脱 (9-3) 提纯所要的片段，洗脱后的DNA以 0.1μg/μl 的浓度再悬浮于TE缓冲液中。另一种方法是将全部消化物都连到合适的M13 载体中("鸟枪法"克隆繁殖)，产生克隆的文库(6-4)。这些克隆与所感兴趣的DNA的放射性探针杂交，以选择出待进行顺序分析的 M13 克隆(16-6)。

注释

(1) 从复杂的 RE 消化物确定那个片段来进行 M13 顺序分析经常是困难的。在这种情况下，将消化物中的全部内容物可与一种准备好的载体相连接，以进行鸟枪法克隆繁殖。此方法产生一个含所有消化片段的 M13 克隆文库。想用于顺序分析的克隆可用能定出感兴趣区域的放射性探针去杂交而被选择出来(16-6)。

(2) 对大片段 (1 000bp 以上)用琼脂糖凝胶，对小片段则用聚丙烯酰胺凝胶电泳。小的片段更容易克隆到 M13 载体中。

(3) 大片段 DNA 聚合酶 I (Klenow) 将有效地把任何 5′ 凸出的 RE 位点转变为平末端。这个酶对转变 3′ 凸出末端为平末端作用较弱。T4 DNA 多聚酶对切平 3′ 凸出末端是一种较好的酶。

16-3 通过连续的 BAL31 外切酶缺失法经 M13 克隆繁殖法制备插入物

提要

本方法用于制备一系列系统的缺失片段，这些片段包括 M13 中待进行顺序分析的

区域。这些待克隆进 M13 多聚衔接区的片段，是用核酸外切酶 BAL31 在距某一单独的 RE 位点一定的距离处被切开的。用这样的策略进行 M13 克隆繁殖，通过分析重叠的、逐步缺失的 M13 克隆，就好像是在穿过一段区域的顺序上“散步”。这个方法包括 6 个步骤：1）将待顺序分析的一段 DNA 片段亚克隆进 pBR 质粒载体；2）制备性繁殖质粒-插入物；3）用一种 RE 切割此质粒；4)用 BAL31 外切酶消化，制备一个比一个缩短的样品；5）磨光 BAL31 消化的末端以形成平滑末端；6）用第二种 RE 消化质粒 DNA，从中移出累进缺失的插入物。通过凝胶电泳和电洗脱制备插入片段，将这一组插入物连接到 M13mp 载体中，被衍生出的这种重叠的片段可用于对感兴趣 DNA 的全顺序进行测定。

实验所需时间

几天

试剂

RE（选择时参见下文）
10 × *RE* 缓冲液(5-4)
SS-苯酚
氯仿
3mol/L 醋酸钠，pH7.4
10×聚合酶缓冲液
DNA 聚合酶 I，大片段（Klenow）5U/μl
dNTP 混合液（dGTP、dATP、dTTP、dCTP 各为 0.5mmol/L），pH7.0
BAL 31 酶，3U/μl（NEBL）
5 × BAL31 缓冲液
3mol/L NaCl
60mmol/L $CaCl_2$
60mmol/L $MgCl_2$
100mmol/L Tris，pH8.0
5mmol/L EDTA
酵母 *tRNA*，10mg/ml
0.5mol/L EGTA，pH8.0
10mmol/L DTT
TE 缓冲液

方法

实验准备

待分析的具不对称末端的长度可达 2kb 的 DNA 片段被亚克隆进质粒载体，用可与 M13 多聚衔接区匹配连接的 RE 位点(如 *Eco*RI-*Bam*HI，*Bam*HI-*Hin*dIII)。质粒亚克隆可参见 15-1—15-3。对此质粒进行制备性增殖(8-2 或 8-3)。

操作步骤

1. 用在不对称克隆繁殖中使用的两种 RE 之一，消化 100μg 为M13 亚克隆繁殖而进行亚克隆生长的质粒。消化时体积为 250μl(5-4)。

2. 在微型胶上检查一份样品，以判定消化是否完全(9-1)。

3. 取出 23μl 消化液到一个微量离心管中并置于冰浴上。其余的227μl 在 -20℃ 冻结。

4. 23μl 消化液中加入：

6μl 5 × BAL31 缓冲液

1μl BAL31 酶

5. 按下面方法 30℃ 保温 1 小时：每 10 分钟取 5μl 到一个新管中。向其中立刻加入 1μl 0.5mol/L EGTA (pH8.0)，以停止 BAL31 反应，并在干冰中冻存。

6. 当全部的样品冻起来后，向每份样品中加 1μl 酵母 tRNA 和20μl 水。

7. 每管都用SS-苯酚/氯仿抽提和乙醇沉淀纯化 DNA(20-1)。

8. 沉淀重新悬浮到 10μl 的 TE 缓冲液中。用琼脂糖凝胶电泳将每个时间点上被消化片段的平均大小与 *Hind* III 切割的 λDNA 分子大小标志相比较(9-2)。

9. 从测定的速度和所缺失的程度，判定按步骤 4 的条件合适地消化亚克隆插入片段所需的时间。

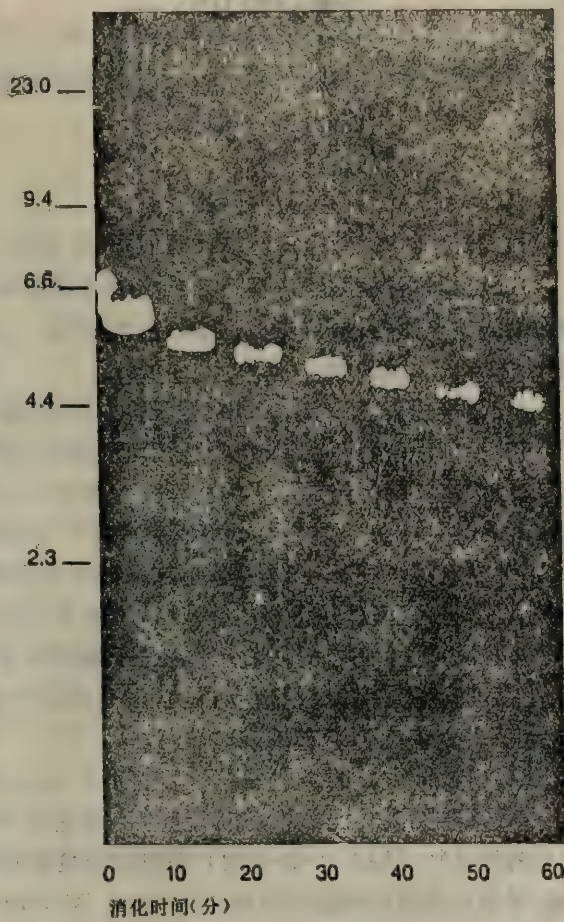


图 16.2 DNA 被 BAL31 完全消化后，在琼脂糖凝胶上用溴乙锭染色后的照片。注意：随着酶消化时间的增加(自左至右)，DNA 分子量下降。

10. 从步骤 3 的样品中移去 25μl 的一份(时间0)，余下的样品用于制备性的 BAL31 消化反应：

冰冻 DNA 消化物(步骤 3)	200μl
5 × BAL 31 缓冲液	60μl
BAL 31 酶 (3U/μl)	10μl
H_2O	30μl

11. 30℃保温。在适当时间分次移出 10 份 30μl 的样品得到一个包括插入区域的缺失范围。每次取出后立刻加3μl 0.5mol/L EGTA (pH8.0)，以终止反应，并在干冰上冰冻。

12. 合并各时间点的样品，并用 SS-苯酚/氯仿抽提及乙醇沉淀提纯 DNA（20-1）[注释(1)]。

13. 沉淀再悬浮于 50μl TE 缓冲液中。

14. 用大片段 DNA 多聚酶 I 补平所有非平滑的末端，以磨平各缺失片段。加到一起：

步骤 13 的 DNA	50μl
10×聚合酶缓冲液	10μl
dNTP 混合液（每种各为0.5mmol/L）	10μl
DNA 聚合酶 I（大片段）	5μl
H_2O	15μl
10mmol/L DTT	10μl

15. 37℃ 保温 15 分钟。70℃ 热灭活 10 分钟。

16. 将缓冲液调节到利于 RE 对那些在所用的质粒亚克隆中未遭 BAL31 核酸外切酶作用的位点进行消化（参见“实验的准备”）。通常，这涉及到用 5-4 所介绍的方法将 DNA 在合适的缓冲液中稀释（如 400μl）。

17. 用第二种 RE 对 DNA 进行完全的消化。

18. 用 SS-苯酚/氯仿抽提及乙醇沉淀提纯 DNA(20-1)。

19. 现在，感兴趣的插入物由于消化程度不同而成为缺失分子长度不同的一组片段。这些片段都共有一个因第二种 RE 消化所产生的一样的末端，又都有一个平滑末端。

20. 现在插入物可在琼脂糖凝胶（9-2）或丙烯酰胺凝胶（9-4）上按大小进行分离。含有其大小允许重叠顺序分析的片段（累进性地递减约200bp）的凝胶被切下来，进行电洗脱（9-3）[注释(2)]。在同一块胶上也走分子量的标志物，从而可比较并测出片段大小。电洗脱充分的胶，可得到一系列重叠的克隆，它们的平均大小将相差 200—250bp，所有这些克隆加在一起，包含了整个 DNA 插入物。

21. 电洗脱后，插入片段样品以接近 0.1μg/μl 的浓度重新悬浮到 TE 缓冲液中。

22. 现在插入物已准备好以待连接到合适的 M13 mp 载体上，载体先经不对称消化使克隆插入物（BAL31-缺失的）平滑末端最靠近唯一的引物区（16-4）。与 BAL 31 缺失的平滑末端相匹配的平滑末端是 *Sma*I 和 *Hinc*II。载体连接的第二个位点必须要与对全部插入片段共同的第二个 RE 位点匹配[注释(3)，(4)]。

注释

(1) 各收集时间点可个别地处理，以保证选择到关系到全部顺序的代表性克隆。采用与第 10 或 11 步同样的操作。按分子大小选出的片段也可由第 20 步得到。

(2) 电洗脱时，可能需要加 tRNA 载体（10mg/ml 贮存液 1μl）以减少样品的丢失。

(3) 产生插入物及对载体选择的一个例子：

质粒亚克隆：1.5kb *Eco*RI-*Hind*III 插入物。

第一次酶切：*Eco*RI 处理然后做 BAL31 缺失并转变为平末端。

第二次酶切：*Hind*III 处理，然后电洗脱。

最终产物：有一个平末端和一个 *Hind*III 切割末端的插入物。

M13 载体：用 *Sma*I 和 *Hind*III 切割的 mp9、mp11 或 mp19。

(4) 克隆繁殖后，用一个对待顺序分析区特异的探针去筛选潜在的感兴趣的克隆通常是有帮助的

(7-1、7-2)。然后,用于顺序分析的 DNA 可由杂交的克隆制备。

16-4 M13 载体的制备和插入物与载体的连接

提要

本方法介绍双链可复制的(RF) M13 噬菌体的制备,双链噬菌体 DNA 消化成线性的载体,其末端可与制备好的插入物的末端相匹配。本节介绍载体制备和制备后插入物的连接。

实验所需时间

4天用于从 M13mp 载体制备 RF

1天用于连接所用载体的制备和连接插入物

试剂

为克隆繁殖制备的 DNA 插入片段(16-2、16-3)

mp 克隆繁殖载体的 M13 RF DNA 0.1μg(例如,可由 BRL 公司购买或预先制备)

LB 培养基

生长于基本琼脂板上的 JM103 或 JM109 集落[注释(1)]

氯霉素,30mg/ml,溶于乙醇中。

2 × YT 培养基

Bacto-蛋白胨	16g
Bacto-酵母抽提物	10g
NaCl	10g

加水至 1L,调 pH 至 7.4

高压灭菌

载体制备用 RE,取决于所制备的插入物(参见 16-2、16-3)

10 × RE 缓冲液(各种)

0.2mol/L EDTA, pH8.0

SS-苯酚

氯仿

3mol/L 醋酸钠, pH7.4

乙醇

10×连接酶缓冲液

T4 DNA连接酶

0.1mol/L *DTT*

方法

实验准备

制备 M13 插入物的策略也应当包括 M13 载体的制备。一旦克隆繁殖的策略被确

定，其 RE 位点与制备的插入物末端是相匹配的，mp 载体应被选择和制备出来。选定的 mp 载体在多聚衔接区应当有一个 RE 位点，使待顺序分析的区域尽可能地靠近其唯一的引物区。mp 载体上的 RE 位点的目录，参见第 4 章。

注意：mp 载体 RF 型可批量购买。如果用买的 RF 做 M13 连接反应，可直接进入步骤 8。

接种的前一天，取 0.1μg 选定的 M13 RF 转移到活化的 JM103 细胞中，如 16-5所述的那样产生蓝斑的板。

M13 RF 的制备

1. 把 2 个 500ml 的三角烧瓶和一个含有 900ml 2 × YT 培养基的 4L 烧瓶高压灭菌。

2. 在灭过菌的 500ml 瓶中放 100ml 的 LB 培养液。用来自M9 基本琼脂板上的一个 JM103集落[注释(2)]接种。37℃ 振荡培养至 600nm处的O.D.达1.0。4℃ 保存这些细胞。

3. 在第二个灭过菌的 500ml 瓶中放 100ml 的 LB 培养基。用 mp 载体板上的一个蓝斑对此培养液接种，方法是用一根灭菌的巴斯德吸管的尖压取一小块带有蓝斑的琼脂并转移到培养液中。37℃ 振荡培养过夜，作为贮存的噬菌体。

第二天

4. 加 100ml 得自步骤 2 的含 JM103 的 LB 培养液到置于 4L 烧瓶中的 900ml 2 × YT 培养液中去。37℃ 振荡培养至 600nm 处的 O.D. 为 1.5。

5. 加 100ml 得自步骤 3 的噬菌体贮液到这些细胞中，开始感染。37℃ 振荡 15 分钟，进行感染。

6. 加 0.5ml 的氯霉素溶液到感染的 JM103 细胞中。37℃ 振荡 1—2 小时，积累 RF DNA。

7. 用8-2所述的 Triton 裂解法从 JM103 宿主菌制备环状的M13 RF DNA(大约为 7kb 的环)，从8-2中的第 9 步收获细胞开始[注释(3)，(4)]。

M13 载体的制备

8. 用限制性内切酶消化2—5μg 合适的M13 RF，使得在多聚衔接区产生一个克隆繁殖位点，其末端应与 16-2、16-3 所制备的插入物相匹配。如果待克隆的片段是不对称的，则需 2 个 RE 位点 (RE 消化参见 5-4)。

9. 每微克 M13 RF DNA 与 2—3U 的 RE 在 20μl 体积中保温 1 小时(用适宜的 RE 缓冲液等)[注释(5)]。

10. 加 1μl 的酵母 tRNA 溶液。

11. 用 SS-苯酚/氯仿抽提并乙醇沉淀，如 20-1 所述。

12. 载体以 0.1$\mu g/\mu l$ 的浓度在 TE 缓冲液中重新悬浮。

13. 在微型胶上(9-1)电泳0.1μg制备的载体，以判定是否完全消化 (即没有环形 RF DNA 残留)。再走 0.1μg 未消化的 DNA 做为对照。环状 RF 消化成线性降低 DNA 在琼脂糖凝胶上的迁移率。

插入物连接进制备好的载体中

14. 对 20μl 产生的 M13 克隆的连接反应按下述组成进行[注释(6)]:

M13 载体(得自第 12 步)[注释(7)]	1μl
适宜的插入物[注释(8)]	0.5—3μl
10×连接酶缓冲液	2μl
T4 DNA 连接酶[注释(9)]	1μl
H_2O 加至 20 μl	

15. 14℃ 保温 4 小时到过夜。

16. 连接物可在 -20℃ 冰冻保存,直至进行对活化的 JM103 细胞转化时使用。

注释

(1) 这里推荐 JM103 细胞,但也可选择其它细胞(参见 16-1)。JM103 有大量的变异体,它对mp衍生的 M13 噬菌体的增殖是一个合适的宿主(参见 16-1)。为得到合适产量的DNA 和 RF, 在制备生长时,JM103 细胞可生长在营养较丰富的培养基中, 如 LB 或 2×YT。但让 JM103 细胞在营养丰富的培养基中生长许多代是危险的,因为这就可能发生 F 附加体的丢失。如果出现这一现象,则 JM103 不能再被 M13 噬菌体感染。因此我们推荐将 JM103 贮存在 M9 基本琼脂板上,每 2—4 周后重新划线接种。当这些细胞做 M13 DNA 的制备性生长或转染时, JM103 可在丰富培养基上生长一短时期, 但要防止在这种培养基上做过长的稳定性的生长。

(2) JM103 菌株维持和贮存在基本营养板上,以防止 F 附加体的丢失。

(3) 一般 M13 RF DNA 的产量为 200—500μg/L。当用 8-2 的方法提纯时,在第一次的 CsCl 垂直梯度中,其上部染色体的溴乙锭带,用 M13RF 制备时要比制备质粒 DNA 时明显得多。

(4) 值得注意的是重组 M13 克隆也能用于生长制备 RF。 从这一生长中能制备双链 DNA 探针并可用于缺口翻译,或制造有用的限制性片段并进一步亚克隆到另一个克隆繁殖载体。

(5) 如果需要两种 RE 来制造所要的载体,只要它们在同样缓冲液条件下都有活性, 则在同一时间里用两种 RE 消化是很便利的(5-4)。如果一种酶需要低盐缓冲液,就先用第一种 RE 消化一小时,然后加盐以满足第二种 RE 的需要,并进行第二个 RE 反应。

(6) 如果仅用一种酶, 那么在进行插入物的连接反应时同时平行做一个不加插入物的对照通常是有用的。在此对照中仅产生由于M13 再环化而产生的蓝色噬菌斑。如果在对照板上出现了明显的透明噬菌斑的本底,则说明用于切割M13 RF 的 RE 破坏了克隆繁殖的位点并使 lacZ 基因失活,或是在M13 载体制备中有外来的 DNA。

(7) 如果所用的载体是对称和平末端的(例如用 *Sma*I 切割),用 2—3 倍的载体和 DNA 对 T4 连接酶在平端连接中的无效加以补偿。

(8) 插入物是否相容取决于它的大小。一般说来, 克隆形成的最适条件为: 插入物的摩尔量大约是载体的 3—4 倍。

(9) T4 连接酶的最适活性需要镁。 必须小心在载体和插入物溶液的反应中不要加入过量的 EDTA。

16-5 M13 转化到 JM103 大肠杆菌宿主中

提要

本节叙述用含有重组 M13 载体 DNA 和插入物的连接混合物转化大肠杆菌细胞

(例如 JM103)的方法，以产生重组M13-感染中心或噬菌斑，这通常可用于 M13 重组噬菌体的制备性生长。然后从这些噬菌斑制备 DNA 以用于随后的顺序分析。

实验所需时间

1 天

特殊装置

用于噬菌体接种的加热装置

试剂

LB 培养基

50mmol/L $CaCl_2$，高压灭菌

LB 顶层琼脂

xgal 溶液，10%，配在 *DMF* 中

IPTG，100mmol/L，配于灭菌的水中

LB 琼脂和基本琼脂板(参见 20-6)

方法

实验准备

制备 LB 培养基。在基本琼脂板上，用一个弯的玻璃棒或白金环在板的表面涂布少量的贮存细胞，对 JM103 大肠杆菌细胞做划痕接种。JM103 集落在板上生长过夜，琼脂面向上。按照 16-4 的叙述制备连接的 M13 克隆。

制备活化的 JM103 细胞

1. 用火焰将接种环灭菌，挑取几个集落的 JM103 细菌细胞。将细胞加到一个含 50ml LB 培养液的无菌的培养瓶中。
2. 37℃ 振荡培养细胞，直至 600nm 处的 O. D. 达到大约 0.3。这约需 2—4 小时。取出 2ml 的细胞，并在 4℃ 贮存于一个无菌试管中。
3. 剩下细胞在 3 000×g 离心 5 分钟。
4. 弃去培养液。重新悬浮细胞在 2—4ml 的 50mmol/L $CaCl_2$ 中。再用这种 $CaCl_2$ 溶液将体积补充到 20ml。
5. 冰浴 20 分钟。
6. 3 000 × g 4℃ 离心细胞 5 分钟。 弃去上清。重新将细胞悬浮在 2.5ml 冰冷的 50mmol/L $CaCl_2$ 中。
7. 4℃ 贮存细胞可达 48 小时，直至准备好进行转化。现在这些细胞是活化的，当贮存于冰上时至少可用 2 天。

活化细胞的转化

8. 要让噬菌斑有合适的密度，以分离出充分数目的克隆，（来自 16-4 的）每种 M13

连接反应物应接种2份：2μl 和 8μl。剩下的每种连接反应物以 10μl 为一份在−20℃冰冻贮存，以便在需要更多的噬菌斑时用。从第7步得到的 150μl 活化的 JM103细胞置无菌的 12×75mm 玻璃管中，将上述 2μl 和 8μl 的两份噬菌体分别加入。冰浴40分钟。

9. 用高压灭菌锅或微波炉融化LB顶部琼脂，然后让它冷至48℃。冷却之后，向每30ml顶部琼脂中加 100μl 的 10% Xgal（溶在 DMP 中）和 100μl 的 0.1mol/LIPTG(足够10个平板)。将这种混合液保持在48℃待用。

10. 对来自步骤8的 JM103/M13 混合液进行热冲击，37℃ 5分钟或42℃ 2分钟。

11. 将步骤2贮存的 JM103 细胞培养至对数生长期，取2滴加到每个将被接种的转化管中。转化管置于48℃加热块干浴中。

12. 对加热块中的转化管，各加 3ml LB 顶层琼脂-IPTG-Xgal 混合物。

13. 将每管中的溶液立即铺在 90mm LB 琼脂板上，旋转平板，使顶层琼脂呈一水平面。

14. 等候15分钟使顶层琼脂凝固。将板加盖并倒置。

15. 平板37℃保温过夜，以使噬菌斑形成及完成颜色指示反应[注释(1)]。

16. 现在噬菌体已可用于顺序分析前的筛选（见 16-6）。

注释

(1) 典型情况下大约培养6小时后，噬菌斑开始变得明显。由于 Xgal 代谢而产生的颜色变化则要等培养8—10小时后才出现。在随后的24小时之内挑取噬菌体。

16-6 用放射性标记探针筛选M13克隆，以选择待顺序分析的插入物

提要

本方法采用专一性的、与感兴趣的 DNA 互补的缺口翻译探针，筛选 M13 载体中同源的DNA插入片段[注释(1)]。当用于(前两节中的)连接和转化的一组插入物仅含有小部分与顺序分析有关的插入片段时，这个方法特别方便。筛选对在顺序分析前鉴定出感兴趣的克隆是一种既快速又有效的技术。

实验所需时间

1天

特殊装置

96孔微量滴定板(如 Costar)

96孔微量滴定多孔移液装置(必要时选用)

无菌牙签

试剂

LB 培养基

用 1.5mol/L NaCl 配制的 0.2mol/L NaOH

用 pH7.4 的 0.4mol/L Tris 配制的 2×SSC 缓冲液

2 × SSC 缓冲液

杂交缓冲液 N[注释(2)]

方法

实验准备

如前一章所述，用 M13 连接和接种转化 JM103 细胞。用 7-1 的方法制备感兴趣的 DNA 缺口翻译探针。

筛选步骤

1. 向 96 孔微量滴定板的每孔中各加 150μl 无菌的 LB 培养液。

2. 从转化板上将每个充分鉴定过的、无色的噬菌斑转移到微量滴定板上，方法是先用牙签触及噬菌斑再触及板上的孔。转移全部无色的待筛选的噬菌斑[注释(3)]。

3. 接种后的微量滴定板在 37℃ 保温 4—6 小时。在进行筛选或用于制备性生长待顺序分析的 DNA 之前，这些板可以贮存 2 周。

4. 如果有 96 孔微量滴定板的多孔移液装置，则用它从每个孔中转移 10μl 感染后的培养液到一张 NC 滤膜上。如果没有这种多孔移液装置，则用移液器及无菌的移液管尖将各点转移到滤膜上。在滤膜上做标记，使各点上清液的排列能正确地定位。

5. 令滤膜在空气中干燥，室温下 15 分钟或 70℃ 5 分钟。

6. 将滤膜在下列溶液各 100ml 中依次浸洗 30 秒钟，使 DNA 变性和被中和。

   0.2mol/L NaOH 含 1.5mol/L NaCl

   2 × SSC 含0.4mol/L pH7.4 的 Tris

   2 × SSC

7. 用 Whatman 3MM 滤纸将 NC 滤膜印干。

8. 滤膜置真空炉中 80℃ 烘干 2 小时。

9. 用 7-2 所叙述的缺口翻译探针进行滤膜与特异性探针的杂交。

10. 按20-5所介绍的方法对杂交的 NC 滤膜进行放射自显影。

11. 阳性克隆在放射自显影上相当于暗点。含有克隆的相应微量孔可供 16-7 中的方法使用。将微量滴定板加盖并保存于 4℃，备用。

注释

(1) 合成的探针也能用于感兴趣克隆的筛选。由于它们的长度较短，可能出现相当有限的选择，如果用 BAL31 的话它并不完全地代表 cDNA 克隆。使用杂交缓冲液 S 及不同的条件，如第 6 章 6 节中对合成探针所记叙。

(2) 参见注释(1)。

（3）筛选噬菌斑的数量取决于获得期望的克隆插入物的可能性。如果可用于连接到载体中的插入物是异源的，那将要测试很多克隆。如果在连接之前将插入物分离纯化，那么需要试验的克隆很少。

16-7 顺序分析用的单链 M13 DNA 的制备

提要

本方法记叙在转化以后进行制备性生长和分离 M13 克隆 DNA 的方法。制备好的 DNA 单链模板将用于顺序分析或其它方面（如用 M13 模板合成探针）。

实验所需时间

第一天：1 小时
第二天：3 小时

试剂

2 × YT 培养基

Bacto 蛋白胨	16g
Bacto 酵母抽提物	10g
NaCl	10g
H_2O	加至 1L

调 pH 至 7.4，高压灭菌

20% PEG-2.5mol/L NaCl 溶液

PEG 8000	20g
NaCl	14.5g

加水至 100ml

TES 缓冲液

20mmol/L Tris，pH7.4
10mmol/L NaCl
0.1mmol/L EDTA（Na_2）

SS-苯酚
氯仿
3mol/L 醋酸钠，pH7.4
乙醇

方法

实验准备

通过氯化钙转化，将适宜的连接反应混合物转化进 JM103 细胞（16-5）中，以制备 M13 转化体。把无色的噬菌斑转移到一个微量滴定板各孔的无菌 LB 培养基中，并用探针筛选，必要时（16-6），选择合适的克隆用于制备性生长和顺序分析。

向 10ml LB 培养基内接种由简化琼脂板上贮存的 JM 103 细胞。使细胞生长到对数期(600nm 处的 O. D. 大约为 0.3)。

操作步骤

1. 在一根无菌的试管中为每个克隆加2ml 2 × YT 培养基[注释(1)]。每管加 20μl 对数生长期的 JM103 细胞。加 20μl 从微量培养板孔中来的感染的 LB 培养基，它们含有待生长和顺序分析的克隆。

2. 在良好的通气条件下，37℃ 培养感染细胞 6—16 小时。

3. 从步骤 2 取 1.25ml 细胞，放入一支 1.5ml 的微量离心管里，室温置微型离心机中离心 5 分钟。将 1ml 的上清液转移到一个新的试管中，小心不要搅动沉淀的细胞。

4. 在含 1ml 上清液的新管中，加 250μl PEG/NaCl 溶液。颠倒混匀并做旋涡振荡。室温放置 10 分钟。

5. 在微量离心机上离心 10 分钟。倾出上清液。用一根棉签或纸捻擦试管内壁。除去所有残留的 PEG 和 2×YT 培养液。用纸捻小心地擦去沉淀上最后的一滴，但不得扰乱 PEG 噬菌体沉淀[注释(2)]。

6. 加 100μl 的 TES 缓冲液。旋涡振荡重新悬浮沉淀。

7. 用 50μl 的 SS-苯酚抽提噬菌体。旋涡振荡混匀。静置 5 分钟，再振荡混匀。在微量离心机中离心 2 分钟分相。

8. 转移上层水相(大约 90μl)到一个新管中。加 90μl 的氯仿。振荡混匀。微量离心机中离心 2 分钟。

9. 转移上层水相(约 80μl)到一个新管中。加 8μl pH7.4 的 3mol/L 醋酸钠。

10. 加 300μl 的乙醇。振荡混匀。干冰上冻 10 分钟。置微量离心机中 4℃ 离心 5 分钟。

11. 倾出乙醇，加 200μl 95% 的乙醇。振荡混匀。微量离心机中离心 5 分钟。

12. 倾出乙醇，沉淀置真空离心机或真空蒸发器上干燥。

13. 在 50μl 的 TES 缓冲液中重新悬浮沉淀。

14. 2.5μl 样品在微型凝胶或琼脂糖凝胶上电泳，以检查 DNA 的回收(9-1 或 9-2)。溴乙锭染色后可清楚地看到噬菌体 DNA。大的插入片段（1kb 以上)会使噬菌体 DNA 的电泳迁移率比无插入物的噬菌体 DNA 慢[注释(3)]。

15. 贮存样品于－20℃。DNA 是非常稳定的，这就是将在单行筛选中做引物延伸、顺序分析、S1 核酸酶实验中所用的 DNA。DNA 的产量将为 0.2—2μg。

注释

(1) LB 培养基可用来代替 2×YT 培养基。

(2) 沉淀将在管底呈现小的点。如果在这一步看不到沉淀，则可能是因为噬菌体 DNA 的产量少于最适量。

(3) M13 DNA 的迁移率不能和双链 DNA标准相比较，如 *Hin* dIII 切割的 λ。

参考文献

M13 Cloning/Dideoxy Sequencing: Instruction Manual. Bethesda Research Laboratories, Gaithers-

burg. Md., 1980.

16-8 M13 克隆的单行筛选分析

提要

本方法用于在许多 M13 DNA 制备物中快速地比较插入物和它们的插入方向。通过本操作程序将便于决定：对哪些克隆应全部做顺序分析，对哪些同胞克隆由于它们不会给予新的信息而应加以剔除。在本方法中通过一个简单的双脱氧核苷酸 dd GTP的顺序分析反应，用与 16-10 全顺序分析类似的方法对每种 M13 进行顺序分析。在测定中，由同胞克隆得到的图谱相同，而同样的对称克隆插入物的相反方向则表现为两种图谱。

实验所需时间

1 天

特殊装置

顺序分析凝胶装置，有电泳板和一个高压电源(例如 2 000V)。

凝胶干燥器

试剂

α-^{32}P-dATP (400Ci/mmol)或 α-^{35}S-dATP (1 000Ci/mmol)(NEN 或 Amersham)

M13 通用引物，17-mer (例如 Collaborative Research, "1 000 反应"，用水稀释到 250μl，分管贮存于－20℃)。DNA 聚合酶 1，大片段，Klenow，5U/μl (BRL)，贮存在－20℃

10×聚合酶缓冲液

0.1mol/L DTT，贮存在－20℃

dGTP, 10mmol/L, pH7.0

dATP, 10mmol/L, pH7.0

dTTP, 10mmol/L, pH7.0

dCTP, 10mmol/L pH7.0

　每种 dNTP，按 50μl 一份贮存于－70℃

ddGTP, 10mmol/L, pH7.0，以 5μl 为一份贮存于－70℃

顺序分析凝胶加样溶液

　950μl 无离子甲酰胺

　50μl 20 × TBE 缓冲液

　0.1mg 的溴酚蓝

　0.1mg 的二甲苯蓝

　分成小份贮存于－20℃

方法

实验准备

配制含 8mol/L 尿素的8%聚丙烯酰胺顺序分析凝胶，40cm 长，如 16-9 所述。

操作步骤

1. 用水稀释 dNTP 贮存液至 2mmol/L
2. 用水稀释 ddGTP 至 0.5mmol/L
3. 从 2mmol/L dNTP 稀释液配制 G° 溶液

   1μl dGTP

   20μl dTTP

   20μl dCTP

   -20℃可贮存4星期

   从步骤1的 2mmol/L 贮备液中再配制一个"追止"溶液:

   25μl dGTP

   25μl dATP

   25μl dTTP

   25μl dCTP

   -20℃可贮存4周

4. 在 1.5ml 微量离心管中对每种 M13 DNA 进行单行引物退火(下列数据按所需管数倍增):

   0.2μl 引物

   0.5μl 10×聚合酶缓冲液

   1.3μl 水

5. 在每个 1.5ml 微量离心管中，加 1μl 的一种 M13 DNA 样品和 2μl 由步骤4得到的混合液。
6. 加热到55℃，让它在1—2小时内缓慢冷却到室温(25℃)。这使引物向 M13 克隆退火。退火之后，离心30秒收集 3μl 的混合液。
7. 按下述的方法配制聚合反应混合物(下面的量供20个单行分析):

   15μl α-^{32}P-dATP 或 α-^{35}S-dATP[注释(1)]

   20μl G° 混合液

   20μl ddGTP (0.5mmol/L 稀释液)

   1μl 0.1mol/L DTT

   1μl 10×聚合酶反应缓冲液

   5μl DNA 聚合酶 I，大片段

8. 将 2.8μl 步骤7的聚合反应混合液加到 3μl 的步骤5退火混合液中。各管在室温下放置10分钟。
9. 加 1μl 追止溶液到每管中。室温下再放置10分钟。
10. 向每管加 4 μl 的顺序分析胶加样溶液。

11. 各管置沸水浴中加热 1 分钟。

12. 将每种样品 2μl 加到顺序分析胶的每个加样槽中。

13. 50W 的条件下电泳，直至样品中的二甲苯蓝染料跑到凝胶全长的一半。在 1 500—2 000V时这通常需要大约 2 小时。二甲苯蓝大约与80bP的成分在电泳上同步[注释(2)]。

14. 将凝胶转到一张 Whatman 3MM 滤纸上。介绍这种转移的详细方法记载在 16-10 的第 13—16 步骤中。 用塑料膜缠裹凝胶， 并在一个大的凝胶干燥器上 80℃ 真空干燥1—2小时[注释(3)]。

15. 根据G终止的单行图谱，选择用于全顺序分析的克隆。并由这些同胞克隆中选出最好的来做全分析[注释(4)]。

注释

(1) 接触放射活性材料要小心。整个过程戴塑料手套。

(2) 电泳的下槽将变成有放射活性的。小心操作。

(3) ^{35}S 标记参见 16-10 注释(5)。干胶后和放射自显影前塑料膜应从凝胶上拿掉。

(4) 单从G碱基即可显示出插入物的相似性。有两种不同方向的对称插入物将显示为两个同胞克隆系列。

参考文献

M13 Cloning/Dideoxy Sequencing: Instruction Manual. B Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, Md., 1980.

Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 74: 5463, 1977.

16-9 聚丙烯酰胺顺序分析凝胶的准备

提要

准备一块 0.4mm 厚、含 8mol/L 尿素的聚丙烯酰胺凝胶，用于单行顺序分析、全顺序分析和 S1 核酸酶试验。这些凝胶可分辨长度从 20bp 到 1kb 的单链 DNA。S1 分析用 5% 的聚丙烯酰胺凝胶，而顺序分析则通常用 8% 的聚丙烯酰胺凝胶。

实验所需时间

2—3 小时

特殊装置

顺序分析凝胶装置(例如 BRL Model SO)[注释(1)]

通常所用的 34 × 40cm 凝胶的玻璃板

间隔垫片、齿形梳及其它用于 0.4mm 厚凝胶的附件

干胶装置，需大到能干燥用于顺序分析的凝胶(如 Bio-Rad)。10和 60ml 注射器

试剂

丙烯酰胺(例如 Biorad 超纯品)

双丙烯酰胺

尿素(例如 Biorad 超纯品)

二氯二甲基硅烷,溶于 5% 氯仿中

丙烯酰胺溶液(预先配制):

8% 顺序分析凝胶	5%S1 凝胶
50ml 水	53ml 水
48g 尿素	48g 尿素
7.6g 丙烯酰胺	4.75g 丙烯酰胺
0.4g 双丙烯酰胺	0.25g 双丙烯酰胺

搅拌直至溶液均匀。加 5ml 的 20×TBE 缓冲液。通过一个 0.22μm 滤膜真空过滤,除去所有的颗粒。将溶液放在一个三角真空烧瓶中真空脱气 5 分钟。

20 × TBE 缓冲液(和 1 × TBE)

1 × TBE 配制的 0.8% 琼脂糖

TEMED (BioRad)

10% 过硫酸铵,置暗处 4℃ 下可贮存 2—3 天

顺序分析加样溶液

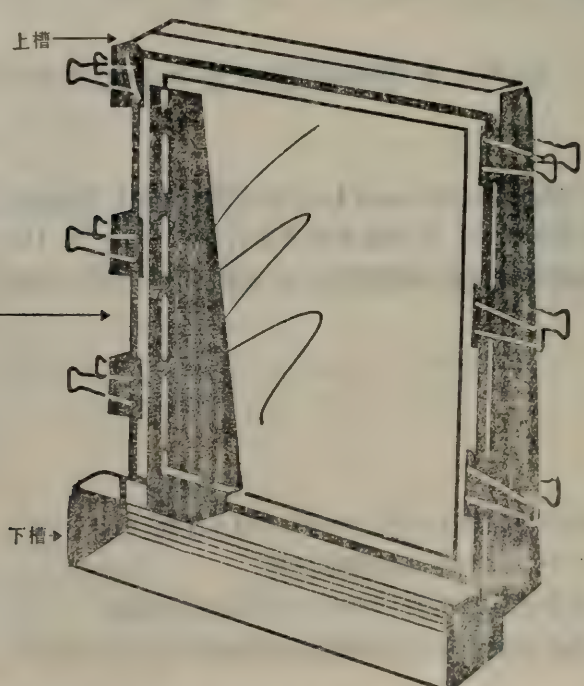


图 16.3 顺序分析凝胶装置图。把两块玻璃板之间的胶用夹子固定到装置上。凝胶开放的底部放入下面的缓冲液槽中,凝胶开放的顶部靠近上面的缓冲液槽。凝胶固定到位后,将两个槽都充满电泳缓冲液,将样品加入凝胶顶端的加样孔中,接通电源进行电泳。

950μl 的去离子甲酰胺

50μl 的 20×TBE 缓冲液

0.1mg 溴酚蓝

0.1mg 二甲苯蓝

方法

板的制备

1. 用肥皂和水清洗玻璃板(长的前板是 34 × 42cm;短的后板 34 × 40cm)。用蒸馏水漂洗并空气干燥。

2. 用氯仿配制的 5% 二氯二甲基硅烷对板硅化。戴手套并在通风柜中操作防止吸进蒸气。向板上加 2—3ml 溶液并用纸将其充分铺平直至干燥。

3. 沿着长玻璃板的 3 个边放 1cm 宽的长条 Whatman 3MM 滤纸，留下一条短边。用较短的那块板盖在上面并把两块板夹在一起。滤纸的作用是作为两块板之间的间隔。也可以用买来的 0.4mm 塑料垫片。长板的延伸端是在未密封的那个方向，这一端将相当于凝胶的顶部。

4. 用一支 10 或 20ml 注射器和 20 号针头沿着 3 个有垫片的边缘注入 8%(50℃)的琼脂糖加以密封。再夹上几个夹子,并小心地把它们直接夹到垫片上。

5. 将板直立，非密封端向上。

6. 将丙烯酰胺溶液(5% 用于 S1 核酸酶实验，8% 用于顺序分析)放在一个 250ml 烧杯里[注释(2)]。快速地加 20μl TEMED和 1ml 10%过硫酸胺。混匀并赶快取约 50ml 到一支不带针头的60ml 的注射器中。将溶液快速地注入板的开放端，小心地防止向凝胶中带入气泡。周期性地从一边到另一边震动板面,赶出倒胶时形成的所有气泡[注释(3)]。

7. 当板几乎倒满时,将凝胶置于几乎水平的位置并向开口端插入齿形梳,使其夹于两块玻璃板之间,尖端向上。平端进入胶中。将梳牢固地插入胶中,在凝胶顶部形成一条大约 0.4cm 深的槽。固定夹紧,并让胶聚合 1—2 小时[注释(4)]。

8. 聚合后,必须将板及在其中形成的胶夹在电泳装置上。如果用了塑料垫片,底部的垫片必须拿掉。将齿形梳倒转，使其齿插入凝胶顶部已形成的槽中约 1mm。不得把齿推入凝胶太深。较短的板被密封贴在电泳装置上，而较长的板在前面。柔韧的氯丁橡胶垫在电泳板和电泳装置之间，将长板的顶部边缘与上槽密封。顶部周围可用热的琼脂糖溶液注射到垫片的周围而得到更完全的密封[注释(5)]。

9. 向顺序分析胶装置的上、下槽中各加入大约 800ml 的1 × TBE 缓冲液。必要时还须检查上槽有无泄漏现象并加以修复。如果凝胶下有气泡停留，用一个接到注射器上的弯针头注入 1×TBE 以除掉气泡。

10. 用 1×TBE 缓冲液冲洗齿间的空间,除掉扩散到胶外来的尿素。

11. 向加样槽(齿之间的空间)加 2μl 的顺序分析加样溶液(无 DNA 或反应物)。50W 恒功率电压电泳，直到染料前沿进入胶几厘米[注释(6)]。还要检查孔之间有无泄漏,染料应该仅存在于相间的行中,不应漏到邻近的行中。

12. 为做顺序分析或 S1 反应的凝胶及设备现已准备好,其典型条件下的电泳是在 50 W 恒功率下进行的[注释(7)]。

注释

（1）顺序分析凝胶装置的安装和工作的精确方法因所用设备的型号而异，参见设备所附说明书。

（2）可制备缓冲的梯度胶代替单一浓度的顺序分析胶。这样可减低较小片段在胶底部的迁移率，从而有效地增加分辨率。这就要用1× 和5× 两种溶液代替仅用1种 1×(1 × TBE) 的丙烯酰胺溶液。5× 溶液由 7.5ml 水、12g 尿素、1.9g 丙烯酰胺、0.1g 双丙烯酰胺和6.25ml 20 × TBE 混合配制而成。两种溶液在冰浴中冷至15℃，并在每种溶液中加 20ml TEMED。用 25ml 吸管取出 12ml 的 1×TBE 溶液，接着用同一吸管再小心地吸出 12ml 5 × TBE 溶液。让空气泡通过吸管由上端逸出，起轻轻混合的作用。将吸管中的液体放到凝胶板中。按照步骤7所述，用 1×TBE 溶液补足余下的板体积。

（3）如果出现泄漏，则可沿着底部加封，方法是用 5μl 的 TEMED 混合到 2ml 的丙烯酰胺溶液中，并快速注到两板之间漏的位置上，形成快速聚合的凝胶条。然后如步骤6所述，将留下的溶液注入凝胶槽中。

（4）对进行顺序分析或单行定序反应 1—2 小时的聚合时间是最常用的。

（5）插进齿形梳之前，要彻底冲洗槽。

（6）此条件可在分离时保持凝胶温度。加较高的功率会使玻璃板爆裂。

（7）见注释(1)和注释(6)。

16-10 M13 克隆的顺序分析

提要

本方法用于对克隆 M13 载体中的插入物做核苷酸顺序的测定。将一段 17-mer 的寡核苷酸引物退火到M13 载体上靠近多聚衔接克隆繁殖区的位置上，形成用大片段DNA聚合酶 I（也称 Klenow 聚合酶）通过克隆的插入片段延伸的引物。

引物延伸产物的一小部分在各个反应管中将分别终止在 G、A、T 或是C 碱基的位置，这是由于在引物延伸反应混合物中的一种特异性的双脱氧核苷酸参入到新合成的链中，代替了相应的脱氧核苷酸。通过测定在延伸的 DNA 链中的每个位置上究竟是4种核苷酸中的哪一种会起终止作用，就能测出核苷酸顺序。双脱氧顺序分析法在 16-1 中曾有详尽的叙述。图 16.1 是这一操作程序的示意图。在本节记叙的操作程序是 BRL M13 “Cloning/Dideoxy Sequencing Manual”（参见参考文献）中所述方法的改良。

可在同一时间对几个 M13 克隆同时进行顺序分析。每个样品在顺序分析胶上用8行（即4种反应物，进行短时间和长时间电泳）来对引物后的 300bP 做顺序分析。当用 16-3 的方法用 BAL 31 缺失克隆繁殖测定较长的顺序时，则可同时对依次消化的克隆的插入物做顺序分析，以测定其全顺序。

实验所需时间

2 小时：进行反应

6 小时：进行顺序分析凝胶电泳

2 小时：干胶

1—2 天：放射自显影

特殊设备

16-9 所记述的顺序分析凝胶装置

可用于 35 × 40cm 凝胶的凝胶干燥器

试剂

α-³²P-dATP (400Ci/mmol) 或 α-³⁵S-dATP (1 000Ci/mmol)[注释(1),(2)]

M13 通用引物,17-mer(如 Collaborative Research,"1 000 反应")用水稀释到 250μl,−20℃ 保存

DNA 聚合酶 I,大片段,Klenow,5U/μl,−20℃ 保存 (BRL)

10×聚合酶反应缓冲液,−20℃ 保存

0.1mol/L DTT,−20℃ 保存

dGTP,dATP,dTTP 和 dCTP,分别用水稀释至 10mmol/L,并用 NaOH 调到 pH 7.0。以 50μl 为一份分别贮存于 −70℃,可放一年。

配制每种 dNTP 的工作液,将贮存液用水稀释到 2mmol/L。在下面所述的方法中要用到这些稀释液。2mmol/L 稀释液分别贮存于 −20℃ 可达 4 周。

ddGTP,ddATP,ddTTP 和 ddCTP,每种都为 10mmol/L,pH7。分别以 5μl 一份贮存于−70℃(可按 20-3 中的方法测定浓度)。

对每种 ddNTP 一份做如下的稀释:

ddGTP,稀释 20 倍为 0.5mmol/L

ddATP,稀释40倍为0.25mmol/L [注释(3)]

ddTTP,稀释 10 倍为 1.0mmol/L

ddCTP,稀释 20 倍为 0.5mmol/L

这些稀释液将用于下面所述的方法中[注释(4)]。−20℃ 可贮存到 2—4 周。

ddATP,0.06mmol/L,pH7 (10mmol/L 贮液稀释 160 倍) 用于 ³⁵S-dATP 顺序分析[注释(5)]。

顺序分析凝胶加样溶液

950μl 无离子甲酰胺

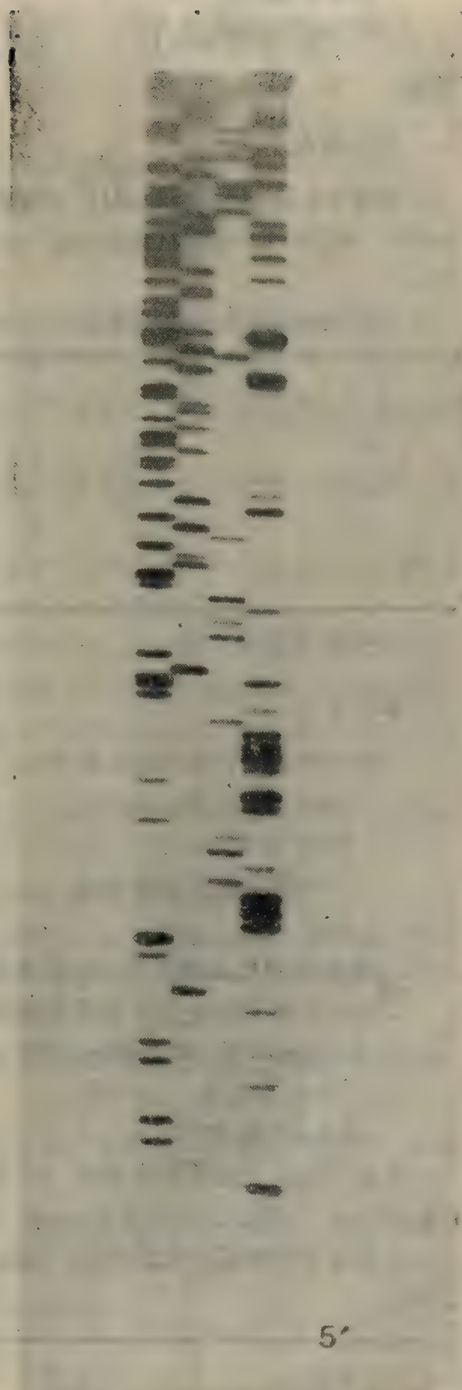


图 16.4 DNA 顺序分析胶的放射自显影照片

50μl 20×*TBE* 缓冲液
0.1mg 溴酚蓝
0.1mg 二甲苯蓝

方法

实验准备

制备 8% 丙烯酰胺、8mol/L 尿素顺序分析胶，如 16-9 所述。用 2mmol/L dGTP、dATP、dTTP 和 dCTP 稀释液各 25μl 混合，制备 100μl 追止溶液(−20℃ 可贮存 4 周)。

由 2mmol/L 贮存液制备 G°，A°，T° 和 C° 溶液:

	dGTP	dATP	dTTP	dCTP
G°	1μl	−	20μl	20μl
A°	20μl	−	20μl	20μl
T°	20μl	−	1μl	20μl
C°	20μl	−	20μl	1μl

−20℃ 可贮存 4 周。

准备反应

1. 每个样品按下述方法制备 9.5μl 的退火混合液:

DNA 样品(来自 16-7)	5μl
引物 (17-mer)	1μl
10×聚合酶反应缓冲液	1.5μl
H_2O	2μl

混合物 55℃ 加热 5 分钟。在水浴中冷却 1—2 小时到室温(25℃)，使引物退火。

2. 为每个样品制备 5μl 的聚合酶混合液:

α-^{32}P-dATP 或 α-^{35}S-dATP	3μl
DNA 聚合酶 I，大片段	1μl
0.1mol/L DTT	1μl

3. 加 9.5μl 的退火混合液到 5μl 的聚合酶混合液中，形成 14.5μl 的引物模板混合液。

4. 为每个待顺序分析的 M13 克隆，准备 4 个反应管，标上 G、A、T 和 C，其内含物如下:

G 管	A 管	T 管	C 管
1μlG°	1μlA°	1μlT°	1μlC°
1μl ddGTP	1μl ddATP	1μl ddTTP	1μl ddCTP

注意：用在“试剂”一节中指出的4种 ddNTP 稀释液。如用 α-^{35}S-dATP 代替 ^{32}P，就用 1μl 0.06mmol/L dATP 加到A管中代替 1μl 的 0.25mmol/L 稀释液。

5. 向上述4管中的每一管，加 3μl 由步骤3得到的 14.5μl 引物模板混合液。

引物延伸

6. 室温下将各管放置10分钟。

7. 每管加 1μl 的追止溶液。室温下放置10分钟。

样品的凝胶电泳

8. 向每管加 4μl 顺序分析胶加样溶液。沸水浴中保温1分钟使引物延伸链变性。

9. 如16-9所述，从每管取 2μl 加到8%丙烯酰胺顺序分析胶的各行上。将每个待顺序分析的 M13 克隆来的 G、A、T 和 C 反应的样品加到凝胶上相邻的4行上。胶上各样品组不对称地加样对以后的定向是有用的。

10. 在 50W 恒功率下电泳大约2小时直到较低的染料带（溴酚蓝）接近胶底部。这可以分辨开头的 100—150bP（短电泳）。

11. 第二次从同样的4管中再各取 2μl 样品加样、并在顺序分析胶上电泳5小时，直到二甲苯蓝迁移 60—70cm。这可以分辨 150—300bp 的核苷酸（长电泳）。

如果有地方，也可在同一块凝胶上进行长、短两种电泳，这样做时长电泳样品为3.5—4小时，直到二甲苯蓝染料前沿处于凝胶底部。将步骤8的样品再重新沸腾一分钟，第二次再每种各加 2μl 样品（短电泳）于此同一凝胶的4个相邻的孔中。再电泳2小时，直到新加的二甲苯蓝染料前沿移到凝胶下面 20cm 处。

12. 当胶完全电泳完毕，切断电源并小心地取下夹子和移开玻璃板。凝胶通常牢固地粘在一块玻璃板上[注释(6)，(7)]。

13. 剪下一张比凝胶稍大一些的 Whatman 3MM 滤纸，紧压在凝胶上面。

14. 小心翻转纸-凝胶-玻璃板，将玻璃板翻到顶上。除去顶部玻璃。凝胶现在附在 3MM 滤纸上。用塑料纸包盖凝胶并放在真空凝胶干燥器中。真空下 80℃ 干胶 1—2 小时。时间的长短取决于真空度。

15. 干胶后，如用 ^{35}S-dATP，则在放射自显影前，塑料薄膜要从胶上剥掉，如用 ^{32}P-dATP，可保留塑料薄膜。

16. 测定凝胶与加样和标志的方向。用 XAR-5 胶片做放射自显影。凝胶的一面朝向胶片。室温下无增感屏曝光过夜。冲洗胶片。

17. 与克隆的 DNA 逆向互补链的顺序可以从底部（最近引物处）读起，由在步骤9和10短电泳的行开始。较长的引物延伸部分在步骤11的前4行分辨较好。在两组样品的电泳中重叠的顺序将指示如何去合并两部分读出的结果。

注释

(1) 在操作放射性材料时要小心，全部操作过程都要戴手套。

(2) α-^{32}P-dATP 或 α^{35}S-dATP 都可被用于在 M13 顺序分析中标记引物-延伸链。在凝胶放射自显影上，^{35}S给出的分辨度较好，但曝光时间较长。同时，^{35}S 是一种低能放射源，一般来说操作时较安全。

^{35}S 和 ^{32}P 方法的主要不同点是 ddATP 的稀释度。

(3) 参见注释(2)。

(4) ddNTP 的稀释决定操作中终止的速度。较高的 ddNTP 浓度将产生较短的链，低浓度则产生较长的链。ddNTP 浓度的改变可能改进顺序的"测定不足"或"测定过分"的问题。这里给出的是平均值，它们对于测定插入物的最前面的 300bp 会提供良好的终止范围。

(5) 参见注释(2)。

(6) 可用镊子的边缘撬起玻璃板并小心地脱离开凝胶。凝胶附着的板在下并慢慢地拿掉顶上的板。在进一步分析时，注意样品的方向，这与胶粘在哪块板上有关。

(7) 如用 ^{35}S 做顺序分析反应，可去除胶中的尿素，因为尿素可能引起淬灭。小心把胶板放在 40×50×5cm 的槽中，用 1L 5% 甲醇/5% 醋酸覆盖。保温 20—30 分钟让尿素从凝胶中逸出。当心不要让胶从板上滑掉。虹吸出液体并继续进入步骤 13。^{35}S 顺序分析，可参阅：Williams, S. A. *et al.*, *Biotechniques* **4**:138, 1986; Ornstein, D. L. and Kashdan, M. A., *Biotechniques* **3**: 476, 1985.

参考文献

MB cloning/ Dideoxy Sequencing Manual, BRL, Gaithersburg, Md., 1980.

Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R., *Proc. Natl. Acad. Sci.,USA* **74**: 5463, 1977.

(李安丽译 姚志建 沈倍奋校)

第 17 章 克隆 DNA 的进一步鉴定

17-1 S1 核酸酶保护性试验

提要

本试验可在 RNA 转录本中精确地鉴定出有关基因的边界，包括内含子/外显子的连接和转录本的 5′ 或 3′ 端。本试验还可在 RNA 和标记的 DNA 探针间做特异性比较。本方法比 Northern 印迹法更为严格和敏感，但也较为冗长和需要较多的有关被表达和分析的基因结构的知识。

S1 核酸酶试验方法基于单链 DNA 可被核酸内切酶消化。因此，如果 ^{32}P-DNA 探针未与杂交的 RNA 呈精确的碱基配对，多余的未被 RNA 杂交的尾部或环状结构将被切开。分辨未消化的不被 S1 作用的部分将提供关于探针和起保护作用的 mRNA 之间顺序相同部分的细节。

本方法可分为以下 8 步:

1. 由 M13 克隆开始，此 M13 的引物延伸产物将与感兴趣的总 RNA 或多聚（A^+）RNA 互补。
2. 通过由 M13 克隆的通用的引物位点开始的启动子延伸，制造放射性标记互补复本。
3. 用合适的限制性内切酶在启动子延伸探针中切断克隆的插入物以外的部分。
4. 在变性的琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶上电泳，以分离探针。
5. 由凝胶上电洗脱下探针。
6. 在极严格的条件下将探针与 RNA 样品杂交，使之仅仅生成 RNA-DNA 复合体。
7. 用 S1 核酸酶处理，探针的非杂交的部分将被消化。
8. 变性并在高分辨的变性凝胶上电泳，以显示和测出被保护部分和杂交部分的大小。

所需时间

第 1 天：制备杂交探针，8 小时(步骤 1—6)

第 2 天：进行 S1 核酸酶反应并在凝胶上电泳，4—5 小时(步骤 7—8)

第 3 天：1 小时用于分析凝胶

特殊装备

微型胶装置

顺序分析凝胶装置和板

液体闪烁计数器

干胶器

试剂

引物：17-mer 通用性启动子(例如,Collaborative Research)

10×聚合酶缓冲液

α-^{32}P-dATP，400Ci/mmol（NEN，Amersham）

A^0 混合物：由 2mmol/L 的贮存液中取 dGTP、dTTP 和 dCTP 各 20μl

DNA 聚合酶 I,大片段，Klenow，5U/μl（BRL）追止溶液，dATP、dTTP、dCTP 和 dGTP 各 0.5mmol/L（如 M13 顺序分析中一样,见 16-10）

限制性内切酶和限制性内切酶缓冲液(根据所用的克隆选用)

10×碱性变性胶缓冲液

300mmol/L NaOH

20mmol/L EDTA

碱性胶加样缓冲液

0.3% 溴甲酚绿

50% 甘油

50% 10×碱性变性胶缓冲液

1×TBE 缓冲液

SS-苯酚

氯仿

3mol/L 醋酸钠，pH7

乙醇

杂交缓冲液(10×)

200 mmol/L Tris，pH 7.4

4mol/L NaCl

10 mmol/L EDTA

0.1mol/L DTT

10% *SDS*

甲酰胺(去离子)

鲑鱼精子 DNA，2mg/ml，沸水浴中煮 5 分钟令其变性,贮存于 4℃

S1 核酸酶,由干粉配制 33U/μl（BM），可存 1 个月

S1 缓冲液(5×)

3ml 5mol/L NaCl

1.66ml 100mmol/L $ZnSO_4$

1ml 3mol/L 醋酸钠，pH4.5

4.33 ml H_2O

酵母 *tRNA*，10mg/ml

电泳加样液

850μl 甲酰胺(去离子)

50μl 20×*TBE* 缓冲液

50μl 二甲苯蓝

50μl 溴甲酚蓝

TE 缓冲液

pBR322

Eco RI

Hin fI

方法

实验准备

准备携有感兴趣的插入 DNA 的 M13;应该知道插入 DNA 的顺序,并在启动子延伸时产生一个互补于感兴趣的 RNA 的探针。在全部操作中需戴手套并使用无菌或高压消毒的塑料制品。准备欲与探针 (每管 10—30μg,真空中离心干燥)杂交的 RNA 样品。如果用多聚 (A^+) RNA,每管加 2μg。准备用于聚丙烯酰胺凝胶电泳的 ^{32}P-标记的分子大小标志。

引物延伸

1. 对每一次反应,在 1.5ml 微型离心管中混合下列物质:

   1μl 引物

   1.5μl 聚合缓冲液

   2.5μl 水

2. 加 5μl M13 DNA (按 16-7 准备)混合。稍离心以使全部内容物聚于管底。样品置55℃ 水浴中。将水浴从热源移开,使其逐渐冷却,最后使水浴与试管都达到室温。此操作约需 1 小时。

3. 依次加入下列溶液以起动引物延伸反应

   4μl α-^{32}P-dATP[注释(1)]

   4μl A^0 混合物

   1μl 0.1 mol/L DTT

   1μl DNA 聚合酶 I,大片段 (5U/μl)

   稍离心使全部内容物聚于管底。

4. 室温下放置 10 分钟。

5. 加 2μl 追止溶液。

6. 室温下再放置 10 分钟。

7. 用 SS-苯酚/氯仿抽提 DNA 并用乙醇沉淀,如 20-1 所叙。在适当的 RE 缓冲液中重新溶解沉淀物。用限制性内切酶切割引物延伸 M13克隆(5-4)。选择在载体中预期要与 mRNA 杂交的插入物以外的部分有单一切点的限制性内切酶。不得切割插入物(参见图 17.1)。限制性内切酶消化反应的总体积为 20μl (5-4)。

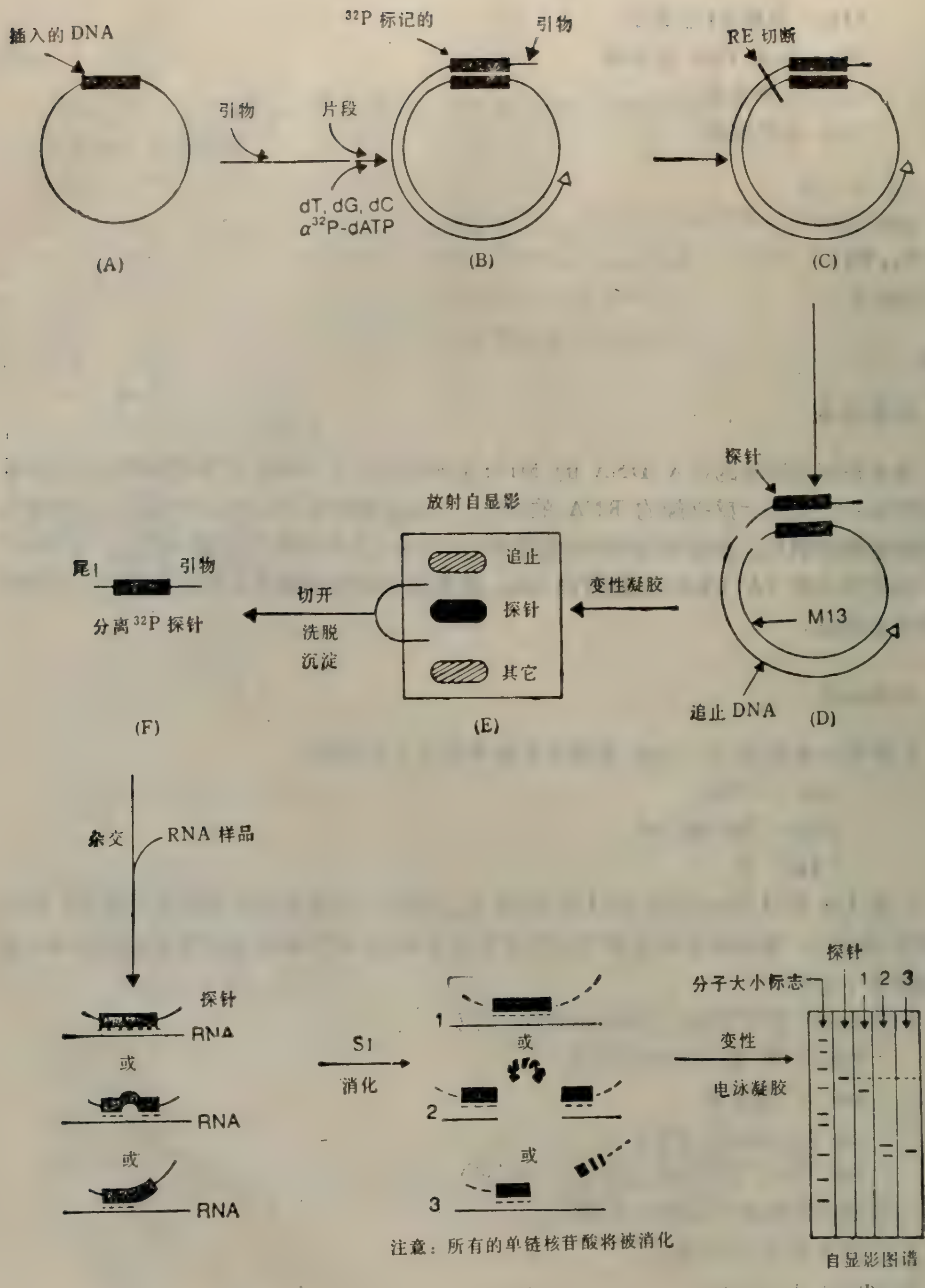


图 17.1 S1核酸酶保护试验示意图。(A)分离携有感兴趣的 DNA 插入物的M13 载体。(B) 从引物区延伸合成第二条放射性标记的核苷酸的链。(C) 用合适的限制性内切酶在离开插入物区一段距离处切下双链的产物。(D) 在变性凝胶上分离切下的产物。(E) 由放射自显影谱鉴定出放射性标记的探针及与感兴趣的 DNA 互补的部分。(F)由凝胶上分离出探针。(G)探针与 RNA 样品杂交(注意至少有 3 种可能的情况存在,它们将在凝胶上显示不同的谱带。(H) 杂交产物被 S1 核酸酶消化,全部单链的核苷酸被消化。(I) 样品在变性的聚丙烯酰胺凝胶上电泳以测定未消化的("被保护的")杂交的片段的大小。

8. 在限制性内切酶消化后，加 5μl 碱性胶加样缓冲液，置冰浴中。

提纯探针，碱变性琼脂糖凝胶 [注释(2)]

9. 按下述方法制备凝胶：22.5ml H_2O 与 0.25g 琼脂糖置 125ml 三角烧瓶中，在微波炉(或沸水浴)中沸腾 2 分钟。向琼脂糖溶液中加 2.5ml 10× 变性的凝胶缓冲液。必要时用水补充至 25ml。旋转混合。取 14ml 放到微型凝胶板上，放上 0.85cm 齿形梳(微型胶操作参见 9-1)。凝胶硬化 30 分钟后，置微型胶装置中，放 500ml 1×碱性变性凝胶缓冲液。

10. 将由第 8 步得到的样品沸腾 2 分钟。

11. 凝胶准备好后，将煮沸过的样品加到凝胶上 (25μl)。

12. 50V 下电泳，至染料前进到约为胶的一半处(1—1.5 小时)。现在凝胶装置已成为放射性的，要采取适当的操作。

13. 将凝胶由装置上取下，用清洁的塑料膜包起来 (Saran Wrap 很好用)。在暗室中，将包着的凝胶对 X 线曝光 30 秒到几分钟[注释(3)]。标明凝胶在胶片上的位置，以供曝光与冲洗后将放射自显影谱与胶对齐。

14. 将胶片叠在凝胶上，用一把未用过的刀片小心切下引物延伸的 DNA 插入物。典型的情况下，探针会在 3 条主要的放射自显影谱带的中间一条(如图示)。如果对选定的谱带有疑问，可将分子量标志加在胶上同时电泳，以帮助测定合适谱带的分子大小，有助于确定谱带。对小于 1kb 的 S1 探针可以方便地制备一套分子量标志 [注释(4)]。

探针的洗脱

15. 将凝胶与 200μl 1×TBE 缓冲液一起放在透析袋中。用 9-3 的方法电洗脱。探针将留在袋内 [注释(5)]。

16. 将 TBE 缓冲液中的探针从袋中转移到微型离心管中，再用 200μl TBE 缓冲液涮洗透析袋，合并。样品在微型离心机上离心 30 秒，去掉带入的凝胶碎片。将上清液移入新管中。

17. 加等体积的 SS-苯酚和氯仿以提纯探针。充分混合。在微型离心机上离心 1 分钟。上层水相移入新管中。

18. 加 1/10 体积 (40 μl) 3 mol/L 醋酸钠，2 μl tRNA，2.5 倍体积 (1ml) 乙醇。充分混合。在干冰上冰冻 10 分钟。微型离心机上 4℃ 离心 5 分钟。弃去上清液用 200 μl 乙醇涮洗。置微型离心管中 4℃ 离心 5 分钟。小心移去上清液，真空下干燥沉淀。

19. 配制 3.5ml 下述缓冲液：

3ml 去离子的甲酰胺

0.4ml 10×杂交缓冲液

40μl 10% SDS

60μl H_2O

20. 溶解由第 18 步得到的 DNA 沉淀于 300μl 由第19步配制的缓冲液中。

21. 取 5μl 此样品置 5ml 闪烁液中在液闪计数器上计数。将样品体积用步骤 19 配制的缓冲液调到 25 000—100 000cpm/35μl [注释(6)]。

探针与 RNA 杂交

22. 对每份要分析的 RNA 样品在微型离心管中用乙醇沉淀。 用 80% 乙醇涮洗沉淀，真空下干燥沉淀（20-1）。把每一种 RNA 样品干燥后存于 1.5ml 微型离心管中，加 35μl 探针(第 21 步)和 5μl H_2O。有一管则仅含 10μl tRNA 做为对照。旋涡混合以溶解 RNA。稍离心使全部液体聚于管底。

23. 将各管在 75℃ 加热 15 分钟。

24. 精确测定杂交时的保温温度 [注释(7)]。测定的根据是探针顺序中G和C碱基的百分比，其大致的温度是：

40% GC 45℃

50% GC 50℃

60% GC 55℃

25. 在选定的温度下，将各管保温过夜。

第 2 天：S1 核酸酶反应

26. 准备下列混合物(可根据 S1 反应样品的数目按比例增加体积)：

1μl 鲑鱼精子 DNA

1.5μl S1 核酸酶

280μl H_2O

80μl 5 × S1 缓冲液

也可根据经验调整 S1 核酸酶的量，以得到合适的结果。

27. 从保温水浴中**一个个地**取出样品并**立刻**加入 350μl [注释(8)]上述混合物。在管中用移液管吹吸数次，令其充分混合。每换一根管都用一个新的移液管尖。

28. 将各管在 37℃ 保温 1 小时。同时准备一份 8mol/L 尿素、5% 聚丙烯酰胺顺序分析胶，方法参照 16-9 的介绍。

样品提纯

29. 加入 400μl SS-苯酚和 400μl 氯仿。充分混合。在微型离心机上离心 3 分钟。将上层水相移入一新的微量离心管中。

30. 加 1/10 体积 (40μl) 3mol/L 醋酸钠 (pH 7) 和 1ml 乙醇。 充分混合。在干冰上冰冻 10 分钟。在微型离心机上 4℃ 离心 5 分钟。

31. 加 400μl 80% 乙醇洗沉淀。在微型离心机中离心 3 分钟。倾出沉淀。

32. 按第 31 步的方式再用乙醇反复洗。真空下干燥沉淀。

在顺序分析胶上进行电泳

33. 将沉淀重新溶于 3μl TE 缓冲液中。加 4μl 凝胶加样溶液。迴旋振荡以重新溶解沉淀。

34. 将样品沸腾 2 分钟以变性。

35 将 4μl 样品加到 5% 顺序分析胶上，并按 16-9 的方法电泳，约在 50W 进行 3

小时。同时也包括含酵母 RNA 的样品(阴性对照)，一份 10μl 未处理的探针(第 21 步)，一行 4μl 分子量标志，其在加样缓冲液中的变性操作与样品一样(第 33 步和 34 步)，二甲苯蓝染料(光蓝)与大约 150bp 大小的部分一起电泳；电泳一定的时间，直到能分离开预期被 S1 消化的部分。

36. 当电泳完成后，小心地将板分开。压上一张 Whatman 3MM 纸，并轻轻压平。

37. 小心地将胶反转(纸面向下)，并轻轻揭去另一块板。

38. 用清洁的塑料膜盖在胶上，去掉多余的 3MM 纸。

39. 在真空凝胶干燥器上将胶和纸 80℃ 干燥 1—2 小时。

40. －70℃ 过夜，对凝胶进行放射自显影，用增感屏，调整曝光时间，必要时在第一次曝光过夜胶片的基础上，进行第二次曝光。

对凝胶进行分析

41. 如果探针与样品中的 RNA 杂交，将出现一条明显的谱带，其长度较未杂交的探针为短，这是因为限制性内切酶切断处与 M 13 DNA 克隆的顺序有一段距离并在制造探针时有一段引物。如果探针与含有一段 5 个或 5 个以上碱基的内源的非互补区 RNA 杂交，S1 核酸酶将消化这些未配对的碱基。这种消化后的异质双链将以较短的不被 S1 作用的谱带显示在放射自显影谱上。一条代表全长的探针与少量沾染未标记的 M13 的 DNA 模板杂交形成的 DNA-DNA双链的谱带通常在各条样品电泳轨迹中都可见到，这与杂交中所存在的 RNA 无关。特异与样品杂交的那些种 RNA 将出现在样品的电泳轨迹中，但不出现在作为阴性对照的 tRNA 杂交样品轨迹中。

注释

(1) 以适宜的方式操作放射性反应物和废物。在全部操作中戴手套。

(2) 变性的 8mol/L 尿素聚丙烯酰胺凝胶用于提纯探针。碱性琼脂糖凝胶较快速和易于掌握。聚丙烯酰胺凝胶对小片段的探针(即少于 300bp)可能是需要的。参见 16-9，但用 1mm 的垫片。

(3) 对齐胶片与凝胶的角，以测出谱带的位置。在曝光时，放一块玻璃板压住胶片。

(4) *Hin* fI 和 *Eco* RI 切割的 pBR322 标志物对 S1 核酸酶实验是很有用的。为制备 ^{32}P 标志，混合：

1μg pBR322 DNA

2μl 缓冲液：600mmol/L NaCl

60 mmol/L Tris, pH 7.4

60 mmol/L $MgCl_2$

60 mmol/L β-巯基乙醇

4 μl α-^{32}P-ATP (高比活性或低比活性)

0.5μl *Hin* fI, 10U/μl

0.5μl *Eco*RI, 10U/μl

12μl H_2O

37℃ 保温 30 分钟。加 0.5μl DNA 聚合酶 I，大片段 (Klenow)以填平末端。37℃ 保温 15 分钟。65℃ 保温 10 分钟令酶失活。加 1μl 蓝右旋糖酐饱和溶液。用 5ml G50 或 BioRad P10 柱在 TE 缓冲液中层析使未参入的三磷酸盐与参入的部分分离开。收集电泳中与蓝右旋糖酐标志(柱的空体积)跑在一起的

部分。分子大小标志将为998、634、517/506 396、344、298、221、220、154和75bp。

(5) 参见注释(1)。

(6) 如每35 μl 中的 cpm 少于25 000，这个探针可能不能用。 常见的是35μl 探针计数中大于100 000cpm，这时需做合适的调整。

(7) 这些温度是从经验推出的，算的方法是取比在高甲酰胺缓冲液中 DNA-DNA 熔点高5—6℃但低于 RNA-DNA 熔点的温度。 为使试验最适化，建议在进行第一次杂交反应时对一种探针采用靠近预指的合适值附近的几个温度，以从经验上测出最好的试验条件。

(8) 重要的是快速地将混和物加入到每一根管中，并保持温度仍处于保温温度或接近保温温度。

参考文献

Berk, A.J., and Sharp, P. A., *Cell* **12**: 721, 1977.
Casey, J., and Davidson, N., *Nucleic Acids Res.*, **4**: 1539, 1977.
Ley, T., Anagnou, N., Pepe, G., and Nienhaus, A., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA **79**: 4775, 1982.
Vogt, V.M., *Meth. Enzymol.*, **65**: 248, 1980.

(姚志建译 沈倍奋校)

第 18 章　对培养的哺乳动物细胞的转染

18-1　贴壁和非贴壁细胞用提纯的质粒经磷酸钙法转染

提要

这是一个将重组质粒中的克隆化基因引入哺乳动物细胞的有效方法 [注释(1)]。本方法用于非贴壁细胞时与用于贴壁细胞稍有不同 [注释(2)]。

实验所需时间

4—6 小时，再加上细胞生长所需的时间

特殊装置

细胞培养装置(保温箱、生物操作台、自动移液器等)

试剂

2 × HBSP 缓冲液[注释(3)]

1.5mmol/L Na_2HPO_4

10mmol/L KCl

280mmol/L NaCl

12 mmol/L 葡萄糖

50mmol/L HEPES，pH7

配制 100ml 的 2×溶液。0.22μm 滤膜抽滤，分成 5ml一 份，置 －20℃ 保存

15% 甘油配于 1×HBSP 缓冲液中，新鲜配制

2mol/L $CaCl_2$，贮存于 －20℃

磷酸盐缓冲生理盐水 (PBS)

根据所用的细胞选择细胞培养基

方法

实验准备

测试全部用于转染的细胞系对甘油的敏感性 [注释(4)]。制备和提纯转染用的质粒。将全部缓冲液通过 0.22μm 滤膜灭菌。

转染非贴壁细胞(对贴壁细胞，直接阅读“用$CaPO_4$转染贴壁细胞”)

1. 依次混合下列溶液制备 $CaPO_4$/DNA 混合物：

　　H_2O (用于将最终体积配到 1ml)

质粒 DNA (10—25μg)

2mol/L $CaCl_2$，62μl（终浓度为 0.125mol/L）

2×HBSP，500μl

最终体积 1ml。为产生沉淀，将 H_2O 放在一支无菌的 15ml 圆锥形试管的底部。轻轻将 DNA 加到水中，**不要混合**。加 2mol/L $CaCl_2$，**不要混合**。在自动移液器上（如 Pipet-aid）装上 1ml 的移液头，用以加 500μl 2 × HBSP 缓冲液。轻轻将吸管头放入管中，触到管底，慢慢放出缓冲液并吹入大约 5 个气泡，使内容物轻轻地混合[注释(5)]。

2. 室温下置生物操作台上沉淀 15 分钟。溶液应变澄清或稍有混浊。

3. 此时，离心收集细胞。每次转染用 1 × 10^7 个细胞（对 10—25μg 质粒 DNA 而言）。细胞在 500×g 离心 5 分钟。

4. 弃去上清。用 1ml PBS 洗细胞沉淀一次。再离心收集细胞。

5. 在 25μl 1 × HBSP 中重新悬浮细胞。

6. 向细胞中加入 $CaPO_4$/DNA 沉淀，上下吹吸细胞一次。

7. 在生物操作台中室温下放 15 分钟。

8. 加 5ml 完全培养基[(注释 6)]。

9. 接种到 T-25 三角烧瓶或 6cm 组织培养皿中。

10. 在湿润的 CO_2 培养箱中 37℃ 培养 4 小时[注释(7)]。

11. 500 × g 离心 5 分钟收集细胞。

12. 弃去上清液。将沉淀再悬浮于 5ml PBS 中以洗涤细胞。如第 11 步的方法离心。

13. 此时，如果细胞对甘油有抗性，用下述方法进行一次甘油冲击(glycerol shock)。反之，则不得做甘油冲击。

14. 将细胞再悬浮在 1ml 含 15% 甘油的 1×HBSP 溶液中。

15. 37℃ 培养 1—3 分钟(取决于细胞系)。

16. 500 × g 离心 5 分钟去除甘油。弃去上清液。

17. 加 5ml PBS，500 × g 离心 5 分钟，弃去上清液。

18. 将细胞再悬浮在 10ml 完全培养基[注释(8)]含血清、谷氨酰胺、抗生素)中。接种在 10cm 组织培养皿中。

19. 37℃ 在湿润的 CO_2 培养箱中培养 36—48 小时。

20. 必要时，选择稳定的转染体。18-4 介绍了一种选择对 G418 抗性的方法。

用 $CaPO_4$ 转染贴壁细胞

转染前 16—20 小时，用胰蛋白酶处理以移下贴壁生长的细胞，再用胰蛋白酶抑制剂使胰蛋白酶失活[注释(9)]，置完全培养基[注释(10)]中，接种于 T-25 三角烧瓶或 6cm 组织培养皿中，3 × 10^5 细胞/皿。转染前 2—4 小时，从板上移去培养液，加 5ml 完全生长液，在37℃ 培养。

21. 如第 1 步和第 2 步的方法制备 $CaPO_4$/DNA，但都只取一半体积(总量 0.5ml)。

22. 混合物在生物操作台中室温下放 30 分钟。

23. 用移液管上下吹吸以混合沉淀。极慢地接种细胞。不得剧烈地混合，温和地振荡数次。培养液将变为黄色，最后变得混浊。

24. 置湿润的 CO_2 培养箱中 37℃ 培养 4 小时。在培养开始 10 分钟后，由培养箱中移出，并在显微镜下检查培养皿。在细胞的顶端可见到细的沉淀。放回培养箱继续培养。

25. 如果细胞有抗性，则进行甘油冲击(第 14—20 步)[注释(11)]。

26. 对要做冲击处理的细胞，移去培养液并用 5ml PBS 洗一次。移去 PBS，加 1.2ml 15% 配在 1 × HBSP 中的甘油溶液，37℃ 培养 1—3 分钟。

27. 移去甘油(如果用了甘油的话)，用 5ml PBS 再洗一次。移去 PBS，加 5ml 完全培养液。

28. 在湿润的 CO_2 培养箱中培养 36—48 小时 [注释(12)]。

29. 如果需要选择稳定的转染体，在胰蛋白酶处理后，将细胞接种于选择性培养液中。

30. 36—48 小时后收获细胞，分析 RNA、DNA 或蛋白质，以了解转染体的表达。

注释

(1) 本方法是由 Shoshana Segal 博士提供的。

(2) 非贴壁细胞例如 B 细胞系，包括 MPC 11、70Z、1881 等。贴壁细胞例如 L 细胞、3T3、CV-1 等。

(3) 在正式进行 DNA 转染前检查 2×HBSP 缓冲液是否形成沉淀。做法是：进行本方法的第 1 步和第 2 步，但不加 DNA。在细胞培养室中培养 15 分钟后，应出现一种不透明的沉淀。

(4) 进行甘油敏感实验的方法是：

a. 向活跃生长的细胞中加配在 1×HBSP 中的 15% 甘油溶液。

b. 在 37℃ 培养不同的时间，直到 3 分钟。在显微镜下检查。

c. 如果细胞在培养时聚堆或死亡，则在转染后不进行甘油冲击。

(5) 温和的混合可防止降低转染效率的大沉淀的形成。

(6) 完全培养液含：血清、2mmol/L 谷氨酰胺和抗生素。所加血清的百分比取决于细胞系。

(7) CO_2 水平应为 5—7%。

(8) 参见注释(6)。

(9) 胰蛋白酶抑制剂存在于胎牛血清或小牛血清中。为了使胰蛋白酶失活，可加与所用的胰蛋白酶相同体积的血清。

(10) 参见注释(6)。

(11) 参见注释(4)。

(12) 参见注释(7)。

参考文献

Gorman, C., Mcffat, L., and Howard, B., *Mol. Cell. Biol.*, 2: 1044, 1982.
Graham, F., and Van der EB,A., *Virology* 52: 456, 1973.
Parker, B., and Stark, G., *J. Virology* 31: 360, 1979.

18-2 DEAE-右旋糖酐介导的非贴壁和贴壁哺乳动物细胞的转染

提要

将克隆化基因导入哺乳动物的 DEAE-右旋糖酐方法[注释(1)]，是 $CaPO_4$ 转化方法

以外的另一种方法。已观察到这是一种对研究转染基因的短暂表达较好的方法。同时，对某些细胞系来说，它比 $CaPO_4$ 工作得更好，而且易于操作。但是也有些细胞用 $CaPO_4$ 产生的结果较好。

本方法对非贴壁细胞与贴壁细胞是不同的[注释(2)]。

实验所需时间

2个小时

试剂

二乙氨乙基右旋糖酐,DEAE

1 mol/L Tris, pH7.4

被转染细胞的培养液

转染细胞用的质粒 DNA

转染用的哺乳动物细胞[注释(3)]

方法

实验准备

加 0.125g DEAE 右旋糖酐和 25 ml 1mol/L Tris (pH 7.4) 到 500ml 无血清培养液中，配制含 250 μg/ml DEAE 右旋糖酐和 50mmol/L Tris (pH 7.4) 的细胞培养液。37℃ 振荡 30 分钟。过 0.22μm 滤膜灭菌。

非贴壁细胞的转染

1. 在 15ml 圆锥形灭菌管中，500×g 离心 5 分钟收集细胞（每次转化用 1×10^7 细胞)。再将细胞重新悬浮于 5ml 无血清培养液中以洗涤细胞。轻轻混合并 500×g 离心 3 分钟。倾出培养液。
2. 再悬浮细胞于 1ml含 DEAE 右旋糖酐的培养基中(参见“实验准备”),并向这些细胞中加入 10—25μg 质粒 DNA。
3. 37℃ 培养 1 小时。每 15 分钟用移液管吹吸混合一次。
4. 加 9ml 培养液(无血清、谷氨酰胺或抗生素)以洗涤细胞。温和地混合。500×g 离心 5 分钟收集细胞。弃去上清液。重复洗涤一次或数次。
5. 在 10ml 完全培养基中重新悬浮细胞(含血清、2mmol/L 谷氨酰胺和抗生素)。接种到 10ml 组织培养皿中。
6. 37℃ 培养 44—48 小时。
7. 收获细胞并分析转染基因的短暂表达。
8. 必要时,可将收获的细胞接种到选择性培养液中,以建立稳定的转染克隆。

贴壁细胞的转染

9. 转染前 16—20 小时，以每皿 1×10^6 细胞的密度将细胞接种在含 10ml 完全培养液的 10cm 培养皿中。37℃ 培养 16—20 小时。

10. 以 10ml 无血清的培养基取代培养液洗细胞 2 次。

11. 加 5ml 含 10—25μg 质粒 DNA 的 DEAE 右旋糖酐培养液（参见“实验准备”)。

12. 置 37℃ CO_2 培养箱中，根据细胞系的情况，培养 1—3 小时。

13. 用 10ml 无血清培养液洗细胞两次。

14. 加 10ml 完全培养液。

15. 细胞置 CO_2 培养箱中 37℃ 培养 48 小时。

16. 如需检查一时性表达，则将细胞收获以供分析。

17. 必要时，将细胞换置在选择性培养液中以得到稳定的转染体。

注释

（1）本方法由 Shoshana Segal 博士提供。

（2）细胞耐受 DEAE 右旋糖酐培养液的能力各不相同。有些细胞在这类培养液中的耐受力不超过 1 个小时。因此需测试每种细胞株对 DEAE 右旋糖酐的耐受力，并在 1—3 小时的范围内对培养时间做适当的调节。

（3）在培养中有分化倾向的细胞(如 F9 畸胎瘤)，需测试 DEAE 右旋糖酐诱导的分化。

参考文献

Sompayrac ,L., and Danna, K., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **78**: 7575, 1981.
Stafford, J., and Queen, C.,*Nature* **306**: 77, 1983.

18-3 电融合(电击穿技术)

提要

本节介绍一种稳定地将线性的质粒导入培养的哺乳动物细胞基因组的方法。将哺乳动物细胞和线性 DNA 置于排列有金属箔的小池中，向此小池中引入高压脉冲使细胞可被 DNA 穿透，并获取外部的 DNA。吸收进来的 DNA 中的一部分整合入基因组，形成稳定的转化体。如果引入的质粒含有可供选择的标志，则稳定的整合体可因其在选择性培养液中的生长而得到鉴定。本方法主要用于产生稳定的转化体。转化效率基于所用的细胞系，而处于 10^{-4}—10^{-6} 转化体/细胞的范围内。

实验所需时间

1 小时

特殊装置

电融合装置(电击室)[注释(1)]

ISCO 电源 model 494 [注释(2)]或 Prototype Design Servies 的电融合装置

试剂

磷酸盐缓冲生理盐水 (PBS)

由细胞系决定的细胞培养液

方法

实验准备

用限制性内切酶消化(5-4)，使质粒 DNA 线性化。确保质粒的结构在感兴趣的基因区或选择性标志区未被切断。

细胞的准备

1. 收获处于中一后对数生长期的哺乳动物细胞。每次转染用500万个细胞[注释(3)]。
2. 700×g 离心 5 分钟浓缩细胞。
3. 移去培养液，4℃ 下在 5ml PBS 中重新悬浮细胞。
4. 再离心一次。将细胞以 10^7 细胞/ml 的浓度重新悬浮于冰冷的 PBS 中。将细胞转到置在冰上的电击室中。
5. 加入线性化 DNA(1—10μg)，在尽可能小的体积中（5μl 以下）[注释(4)]，按 20-1 中的方法进行抽提，沉淀放 5 分钟。
6. 将电源连到电击室上[注释(5)，(6)]。设电压极限为 2 000V，电流极限为 0.9mA。将瓦特数和电流转盘调至 5%。
7. 接合安全开关，电源经电击室放电。放电后，电源上的电压表将接近于零。在电压接近零以前，不得触及引线。
8. 令系统在冰浴上放 10 分钟。 在无菌条件下转移细胞到培养板或三角烧瓶中，4℃ 下加 10ml 培养基。
9. 让未进行选择的细胞生长 48 小时(用对所用细胞合适的培养液和条件)。
10. 在含有合适的选择性培养液中选择转化体(DNA参入的细胞)，选择标志的水平要足以杀死非转化细胞。例如，在线性化的质粒中参入新霉素基因，细胞就用 G418(18-4)进行选择。

注释

(1) 本文介绍的电击室是自制的。在塑料池的两端嵌入 1mm 厚的铝箔电极。在电路中接入一个可用于高压并合适地屏蔽着的高压放电开关。用前以 70% 乙醇预先将池灭菌。现在已有一种与此类似设计的商品，Smithies 等（见参考文献)报告这种装置能产生可重复的结果。 这种装置可由 Prototype Design Services (P. O. Box 55355, Madison WI 53705) 买到。

(2) 本方法中所用的装置参考 ISCO 电源。用其它电源也是可以的，这取决于电容器的特性。其中一种代用品可参见 Smithies 等的报道。

(3) 在操作中仅用无菌的试管与缓冲液。 戴手套以避免污染。本方法主要用于 B 淋巴细胞，但也成功地用于其它细胞。电振荡脉冲的参数可因不同的细胞系而改变。

(4) DNA 应为 2μg/μl。一般说，可从含一个哺乳动物可选择标志基因(如新霉素； 18-4)的 pBR 质粒结构得到。

(5) 在充电与放电时需非常小心地操作电源及电击室。

(6) 参见注释(1)和(2)。

参考文献*

Falkner, F., and Zachau, H., Nature **310**: 71, 1984.
Neumann, E., Gerisch, G., and Opatz. K., *Naturwissenschaften* **67**: 414, 1980.
Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y., and Hofschneider, P., *EMBO J.*, **1**: 841, 1982.
Potter, H., Weir, L., and Leder, P., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 7161, 1984.
Smithies, O., Gregg, R. G., Boggs, S. S., Koralewski, M. A., and Kucherlapati, R. S., *Nature* **317**. 230, 1985.

18-4 选择转化的哺乳动物细胞：G418 法

提要

本方法应用一个显性的选择标志，以显示转化的外源 DNA 稳定的整合，标志是提供 G418 抗性的 3′ 磷酸转移酶基因。当克隆化 DNA 经转染技术，引入到克隆细胞时，如用 $CaPO_4$、DEAE 右旋糖酐和电融合法(18-1—18-3)，仅一小部分细胞将外源性 DNA 稳定地整合到基因组中。为了找出这些稳定的整合物，在转化的外源性 DNA 中带有显性的基因标志并在这些细胞的基因表型中产生一个可供选择的变化是有用的。已弄清了一些可供选择标志的特征并成功地用于此目的。这包括 TK^- 细胞中的胸腺嘧啶激酶基因和二氢叶酸还原酶基因，后者提供对抗菌性的氨甲喋呤的抗性。还可应用的是黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶基因，它使黄嘌呤在嘌呤补救途径中做底物，在一种含合适的霉酚酸的培养液中其功能是作为一个显性的可供选择的标志。

本节介绍另一种 DNA 转染哺乳动物细胞的显性选择标志。 选择的机制是基于细胞对氨基糖苷类抗菌剂 G 418 的敏感性。 此种抗菌作用影响 80S 核糖核蛋白体的功能和蛋白质的生物合成。细菌的由转座子 Tn5 编码的磷酸转移酶 APH(3′) II(neo) 可使 G418 失活。当此基因的编码顺序排列在哺乳动物转录单位中，可出现有效的表达，因此当它在转染后稳定地整合到基因组中以后，此融合的基因提供对 G418 的抗性。如果此标志基因与其它欲在转化细胞中稳定整合的基因连锁或共同整合，则对 G418 抗性的选择也将同时选择出选定基因的稳定整合和表达。

这个选择系统的某些特征对有效的应用是重要的。哺乳动物细胞对环境培养基中 G418 的浓度的敏感性变化很大，其范围从 100μg/ml 到 1mg/ml。选择所需要的 G418 的量对每种细胞系必须分别测定。 测定合适水平的一种简单方法是将细胞在多孔板上生长，每孔中培养基的 G418 的浓度在某一范围内变动。选择时 G418 的合适量为在 10—14 天里能杀死哺乳动物细胞的最低浓度。因为氨基糖酐主要作用于分裂细胞，在 G418 选择中分裂愈快的细胞愈易被杀死。

一个非常方便的能在大多数哺乳动物细胞中表达的新霉素基因的来源是质粒 pSV 2-neo，这是由 Sorthern 和 Berg 构建的(参见参考文献)[注释(1)]。在这种质粒中，来自 Tn5 的 1.4kb 的新霉素编码顺序是夹在猿猴病毒 40 (SV 40) 前区启动子和 SV 40 小 t 抗原绞接和多聚腺苷酸化区之间。一个融合 mRNA(大约 2kb) 被转录，它起源于 SV40 启动子并被SV40绞接和多聚腺苷酸化区的定位在新霉素编码区 3′ 端的信号所稳定。对一

* Hunt Potter 博士提供用于本方法中的技术信息。

种欲能在哺乳动物细胞宿主中表达的克隆化基因稳定的整合,可通过使有关的 DNA 与 pSV2-neo 质粒在各个可利用的位点等价相连而实现。另一方法是,被研究的基因可存在于另一质粒中与 pSV2-neo 质粒一起转化。经常能实现两种质粒的整合,使得可以在含 G418 的培养基中进行选择。对 CV-1 和 HeLa 细胞经 $CaPO_4$ 沉淀 (10μg DNA/5×10^6 细胞)的转化效率为每 10^4—10^5 细胞一个转化体的水平。效率将因真核宿主细胞的不同而不同,不同的转化技术在不同的细胞系会有或高或低的效率,可凭经验选用合适的系统。哺乳动物细胞中自发地对 G418 的抗性,据报告低于 10^{-7},制备此系统对多种细胞都是实用的(参见参考文献中 Sourthern 和 Berg 的工作)。

同时,3′ 磷酸转移酶基因可用于在大肠杆菌中选择 G418 抗性。选择所需的 G418 或卡那霉素的水平通常都低于真核细胞中所用的水平,范围为 5—20μg/ml。这种选择在为了以后真核细胞转化而构建含有 neo 基因的质粒时,证实是有用的。

注释

(1) 一种含有 neo 选择基因的构建质粒可从 Pharmacia 公司购得。

参考文献

Collbere-Gorapin, F., Horodniceanu, F., Kowilsky, P., and Garapin, A., *J. Mol. Biol.*, **150**: 1, 1981.
Jimenez, A., and Davies, J., *Nature* **287**: 869, 1980.
Southern, P. J., and Berg, P., *J. Mol. Appl. Gen.*, **1**: 327, 1982.

18-5 氯霉素乙酰基转化酶 (CAT) 试验

提要

本方法[注释(1)]主要用于鉴定潜在的真核细胞调节基因,如启动子和增强子。被测试的成分融合在重组 DNA 质粒中的细菌 CAT 基因编码区。此质粒用 $CaPO_4$ 或 DEAE 右旋糖酐法转染到哺乳动物细胞, CAT 酶活性的水平用放射性酶产物的放射自显影法来检验。因此,当转染到相应的真核细胞宿主中时,一个在感兴趣的克隆化 DNA 上的活性启动子或增强子将同样激活 CAT 活性。

实验所需时间

第 1 天: 2 小时
第 2 天: 4 小时

特殊装置

放射自显影装置
裂解细胞用的超声装置
层析缸
旋转蒸发器(如 SpeedVac Concentrator By Savant)
液体闪烁计数器

试剂

磷酸缓冲生理盐水（PBS）

0.25mol/L Tris，pH7.8

^{14}C-氯霉素，40—60mCi/mmol（NEN）

4mmol/L 乙酰辅酶 A（Sigma）。每 2 周新配一次，贮存于 －20℃

乙酸乙酯［注释(2)］

氯仿

甲醇

薄层层析（TLC）板或片

方法

实验准备

通过融合含 CAT 的质粒与被测试的DNA 制备质粒载体［注释(3)］。培养被转染的真核细胞［注释(4)］。准备TLC缸，将一片Whatman 3MM滤纸沿着内沿放在缸中，加 200 ml 氯仿：甲醇(19:1)溶剂以平衡缸内的空气。因为氯仿挥发性很强，每次用时配制新鲜的溶剂系统［注释(5)］。

细胞的转染

1. 用 $CaPO_4$ 或 DEAE 右旋糖酐法（18-1、18-2）以 CAT 结构（25—50μg 质粒 DNA）转染真核细胞(约 1×10^7 细胞)［注释(6)］。
2. 36—48 小时后，收获细胞并用 PBS 洗 3 遍
3. 将细胞重新悬浮于 100μl 0.25mol/L Tris（pH7.8）中。
4. 用超声波破碎细胞。在显微镜下检查细胞，确证它们都被破碎［注释(7)］。
5. 在微型离心机 4℃ 离心 5 分钟，移去细胞碎片。
6. 将上清液转入新的微型离心管中。60℃ 保温 10 分钟以使内源性乙酰基转移酶失活。
7. 在微型离心机中 4℃ 离心 5 分钟。将上清液转入新的微型离心管中。现在上清液已准备好进行 CAT 试验。

CAT 试验

8. 在一个新的微型离心管中混合下列试剂：

    25μl 来自第 7 步的细胞抽提液

    5μl 4mmol/L 乙酰辅酶 A

    18μl H_2O

    1μl ^{14}C-氯霉素

9. 37℃ 保温 1 小时
10. 加 400μl 乙酸乙酯。充分进行旋涡振荡。在微型离心机中离心 1 分钟。将上层有机相移入一新管中。

11. 置旋转蒸发器中对样品进行真空干燥。

12. 将样品重新悬浮于 25μl 乙酸乙酯中。

13. 将样品点在 TLC 板(或片)上。同时点 1μl ^{14}C-氯霉素作为参比。

14. 将 TLC 板或片放在已用 200ml 氯仿/甲醇(19:1)平衡的层析缸中进行层析，至溶剂前沿。

15. 空气干燥并对 X 线片曝光。

16. 冲洗胶片。活性 CAT 将会在比 ^{14}C-氯霉素更向前的地方出现另一个乙酰氯霉素的点。乙酰氯霉素与氯霉素点的相对强度将相应于 CAT 活性。相应于乙酰化或未乙酰化的 ^{14}C-氯霉素可由 TLC 板或片上切下，经液体闪烁计数，以定量 CAT 的活性。

注释

(1) 本方法由 Shoshana Segal 博士提供。

(2) 乙酸乙酯能溶解很多种塑料。用玻璃吸管吸取乙酸乙酯，并在通风橱中操作。

(3) 被检查的启动子/增强子的顺序典型地是与定位在合适的质粒载体上(如 pSVP-CAT 或 pSV2-CAT，见参考文献)的 CAT 编码区连接；含有 CAT 基因衍生物的 pBR322 质粒可由 Pharmacia 公司购得。

(4) 在这里介绍的方法用于来自 CV-1、3T3、HeLa 和中国地鼠卵巢细胞 (CHO) 的提取物(大约来自 10^7 细胞)的方法已被标准化。可根据被分析细胞的数目，将操作程序放大或缩小。

(5) 层析在通风橱中进行。

(6) 对于 CAT 试验来说，$CaPO_4$ 转染通常比 DEAE 右旋糖酐法好用。但某些细胞系似乎对这两种方法中的某一种更为有效。

(7) 用小的超声探头粉碎细胞。被粉碎细胞的量可用台盼蓝排斥法测定。

参考文献

Gorman, G. M., Moffat, L.F., and Howard, B.H., *Mol. Cell. Biol.* 2: 1044, 1982.

(姚志建译　沈倍奋校)

第19章　蛋白质方法

19-1　体外翻译和免疫沉淀

提要

为研究者提供了由部分纯化的 mRNA 鉴定可能的翻译产物的方法。它将 RNA 翻译成蛋白质，并随后用抗体沉淀和聚丙烯酰胺凝胶电泳的方法进行分析。

实验所需时间

第一天：1—2 小时
第二天：2—5 小时

特殊的设备

闪烁计数器
垂直的聚丙烯酰胺凝胶电泳装置

试剂

网织红细胞体系（Amersham Kit N. 90)[注释(1)]
^{35}S-甲硫氨酸，高比放射性，800 Ci/mmol(NEN, Amersham)
10% 三氯醋酸
乙醇
蛋白 A-Sepharose（P-L）
正常家兔血清
免疫沉淀缓冲液
　10mmol/L 三羟甲基氨基甲烷（Tris)，pH7.4
　0.5% aprotinin
　1% Non-idet P-40 (Sigma)
　2mmol/L 乙二胺四乙酸（EDTA）
　0.15mol/L NaCl
所要分离的蛋白质的抗血清
样品缓冲液，即 19-2 的聚丙烯酰胺凝胶电泳的样品缓冲液，使用时稀释成 1×溶液

方法

1. 取 11-1 中的 RNA($10\mu g/2\mu l$) 或 11-3 中的聚 $A^{(+)}$RNA($2\mu g/2\mu l$)置于 1.5ml 的微量管中，65℃ 水浴 2 分钟，使 RNA 样品变性。

2. 按网织红细胞体系试剂盒说明书的要求，应包括空白管(不含 RNA)、阳性对照管

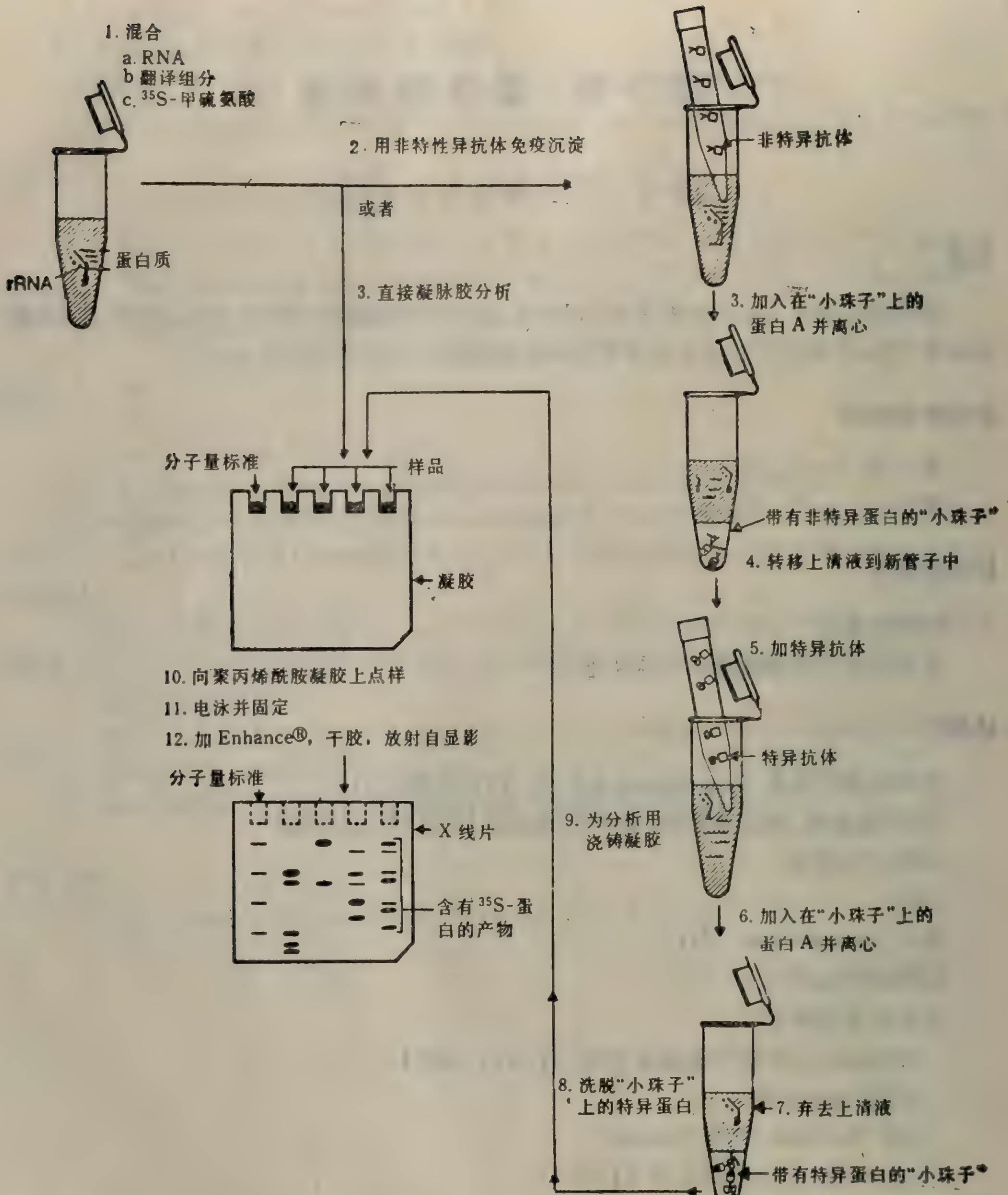


图 19.1 RNA 体外翻译成放射性标记的蛋白质。这个产物能用免疫沉淀法选择出(右半部)或直接在聚丙烯酰胺凝胶上进行分子量分析。图中"小珠子"是惰性载体，例如 Sepharose 小珠。

(含球蛋白 RNA)和样品管。

3. 加入试剂盒中的网织红细胞体系 20μl 和 ^{35}S-甲硫氨酸 5μl。做短暂的离心。

4. 35℃ 保温 1 小时[注释(2)]。

5. 为了测定翻译的效率，在小滤纸片上点 20μl 样品，并将空白和阳性对照点在另外的滤纸片上。剩余的样品置于 −20 ℃ 冰冻保存。

6. 滤纸片浸泡在10% 的三氯醋酸中重新加温到65℃，并保持5分钟，然后用新鲜的三氯醋酸再浸泡一次。

7. 用无水乙醇洗滤纸片，然后在闪烁计数器中计数。若翻译发生，则样品的计数至少是空白对照的3倍，这样即可进行下一步(8)操作，反之，则应测定阳性对照(它约是空白对照的7倍)。若试剂盒中的阳性对照有放射性参入而 RNA 样品没有，则可能是此 RNA 样品不合适。若是阳性对照也没有参入，则是试剂盒失效了。

8. 翻译产物蛋白质可被用于以下2种方法之一。方法之一是用已知的鉴定用抗血清作免疫沉淀，(见第9步)。方法之二是总的翻译产物可直接进行聚丙烯酰胺凝胶电泳并作放射自显影分析(见19-2)。

沉淀和凝胶分离

9. 融化第5步中冻存的翻译产物，加 600μl 免疫沉淀缓冲液，分成2份(每份 300μl)置于1.5ml 的微量塑料离心管中。

10. 每管加 2μl 正常家兔血清[注释(3)]，室温下放置10分钟。

11. 每管中加人 40μl 蛋白 A-Sepharose，4℃ 下轻摇30分钟。

12. 离心1分钟。

13. 将上清液移至另一支新的管子中，弃去旧管子及沉淀物。

14. 向其中的一管中加入 2μl 正常家兔血清，另一管中加入 2μl 合宜稀释度的特异性抗血清[注释(4)]。4℃ 过夜。

15. 向2个管中分别加入 80μl 的蛋白 A-Sepharose，4℃ 下轻摇30分钟。此时轻摇是很重要的。

16. 离心1分钟。弃去上清液。

17. 每份沉淀用 300μl 免疫沉淀缓冲液洗涤。轻轻振摇。离心1分钟。弃去上清液。重复此步操作3次以上。

18. 向每份沉淀中加入 40μl 样品缓冲液，置沸水浴中2分钟。

19. 离心5分钟，将此上清液点样到聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳(见19-2)。

20. 为提高放射自显影的效率，可按照制造厂提供的说明将凝胶在 Enhance 中放置30分钟。

21. 将凝胶干燥，并进行放射自显影的曝光。

22. 冲洗胶片。必要时需调整曝光时间，并再进行曝光。

注释

(1) 还有其它翻译方法，例如麦胚翻译盒。此系统适用于小的蛋白质(约20 000道尔顿以内)。

(2) 1小时是常用的时间，最适宜的时间可根据 RNA 的特性和翻译材料的不同而定。

(3) 其通常的来源是该家兔免疫前的血，也可购买正常的家兔血清。

(4) 稀释度根据经验而定。这是指能有效地沉淀蛋白质的最大稀释度。如果滴度无资料可参考，则以多种稀释度测出进一步使用的最佳浓度。

参考文献

Persson, H., Hennighausen, L., Taub, R., DeGrado, W., and Leder, P., *Science* **225**: 287, 1984.

19-2 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质

提要

将免疫沉淀所得到的蛋白质混合物，按其分子量进行分离，对了解整个蛋白质混合物的组成或评价某种蛋白质的纯度经常是有用的。本方法介绍在电场的作用下使蛋白质通过丙烯酰胺介质而分离的技术。不同蛋白质的电荷效应由于它们都相同地与 SDS 结合而减到最小，从而使分离主要取决于蛋白质的大小(分子量)。

实验所需时间

1 天

特殊装置

蛋白质凝胶电泳仪、板、垫片等(有多个供应商)

凝胶干燥器

试剂

丙烯酰胺：双丙烯酰胺(29:1)，配制成一个未聚合的 30% (w/v) 的水溶液。丙烯酰胺是一种神经毒，操作时要极小心

混合的离子树脂：AG501-X18 (例如 Biorad)分子量标准(高和低的两组)(例如 Biorad) 过硫酸铵，100mg/ml，用前 1—2 天配制。四甲基二乙胺 (TEMED)

10% 甘油，300ml

4×胶缓冲液

Tris 碱 16.95g (1.5mol/L)

加水至 90ml

pH 调至 8.8 (用 HCl 调)

10% SDS 4ml

加水至 100ml

10×电极缓冲液

Tris 碱 30.25g (0.25mol/L)

甘氨酸 144g

加水至 850ml

检查 pH，应为 8.3

10% SDS 100ml

加水至 1 000ml

2×成层胶缓冲液

Tris 碱 3g (0.25mol/L)

加水至 90ml

pH6.8 (用 HCl 调)

10% SDS2ml (0.2%)

用水将体积补足到 100ml

2×样品缓冲液

水 4ml

Tris 碱 0.15g (0.125mol/L)

用 HCl 调 pH 至 6.8

10% SDS 4ml

甘油 1ml

溴酚蓝 20mg(0.02%)

β-巯基乙醇 0.4ml(4%)

用水将体积补足到 10ml

凝胶的漂洗液(每块胶需要 600ml)

50% 甲醇

10% 醋酸

40% 水

考马斯亮蓝 R (Sigma)

方法

实验准备

30% 的丙烯酰胺:双丙烯酰胺(29:1)溶液 1 000ml 中加入 20g 混合离子交换树脂去离子,轻轻振摇,然后用 Whatman 滤纸或 0.22μm 滤器过滤去掉树脂。溶液置于密闭的瓶子中 4℃ 保存。

准备蛋白凝胶电泳的玻板。依次用水、10% SDS、水、乙醇和水冲洗。空气干燥已洗净的玻板。

配制凝胶

1. 无离子的 30% 丙烯酰胺/双丙烯酰胺溶液 25ml 和 4×胶缓冲液 15ml、100μl 过硫酸铵溶液混合。用水将体积补足到 60ml。此胶的浓度将为 12.5%;丙烯酰胺的浓度可根据蛋白质的大小而改变[注释(1)]。

2. 固定两块玻璃板,它们之间用稍微涂有油脂的垫片分开。不同的凝胶系统可能有小的变化,参照制造厂提供的说明书。

3. 加入 TEMED 30μl 催化聚合反应。将 60ml 的胶溶液注入到已准备好的板中,在胶的顶部加几毫升 2×成层胶缓冲液,使丙烯酰胺聚合时形成平滑的表面[注释(2)]。

4. 1 小时后,倒出上层没有聚合的液体。配制顶端成层胶。将 30% 丙烯酰胺/双丙烯酰胺(29:1)溶液 1ml、水 4ml、2× 成层胶缓冲液 5ml、过硫酸铵溶液 10μl 和 5μl TEMED 混合。将足够的成层胶液注满胶上的 3cm 处。嵌入样品槽成型梳,让成层胶聚合。加上

成层胶可以使谱带变窄和提高分辨。

5. 将胶固定在电泳槽中。加入约 500ml 1 × 电极缓冲液至上下槽中，并检查有无液体漏出[注释(3)]。

6. 用吸管来回吸每个样品槽中的电极缓冲液，以清洁样品槽。

7. 10μl 样品(1—100μg 蛋白)[注释(4)]溶液与 10μl 2 × 样品缓冲液混合。95℃ 加热 3分钟，随后将样品加到凝胶上。在 1—2 行中加分子量标准。

8. 电泳进行到蓝色染料前沿刚刚走出胶时为止。 典型的电泳条件是 100V 恒电压，这将使电泳进行 4—6 小时。电泳的时间和电压可依设备和凝胶的厚度而定。

9. 凝胶可以用银染色(见 19-4)或考马斯亮蓝染色(灵敏度低，但简易) [注释(5)]。如果凝胶中有放射活性的氨基酸，就可以进行放射自显影（步骤 10—14， 可染色也可不染色)。

准备放射自显影的凝胶

10. 从板中移出凝胶。为了定方向在胶的右下角切下一小块做为标记。 把胶放在容器中。加入 300ml 漂洗液。放置并定时振摇 1 小时。

11. 弃去液体，然后加入 300ml 新鲜的漂洗液。至少放置 2 小时。

12. 弃去漂洗液[注释(6)]。加入 10% 的甘油 300ml。放置 1—2 小时。

13. 弃去甘油溶液。将凝胶放在干胶器中，80℃ 下真空干燥 1—2 小时。关掉热源后继续保持真空 30 分钟 [注释(7)]。注意在胶干燥之前不得破坏真空，否则胶会破碎。

14. 如果样品有放射性，则对 X 线片 (XAR-5) 曝光 1—3 天。对于 ^{32}P 标记的样品

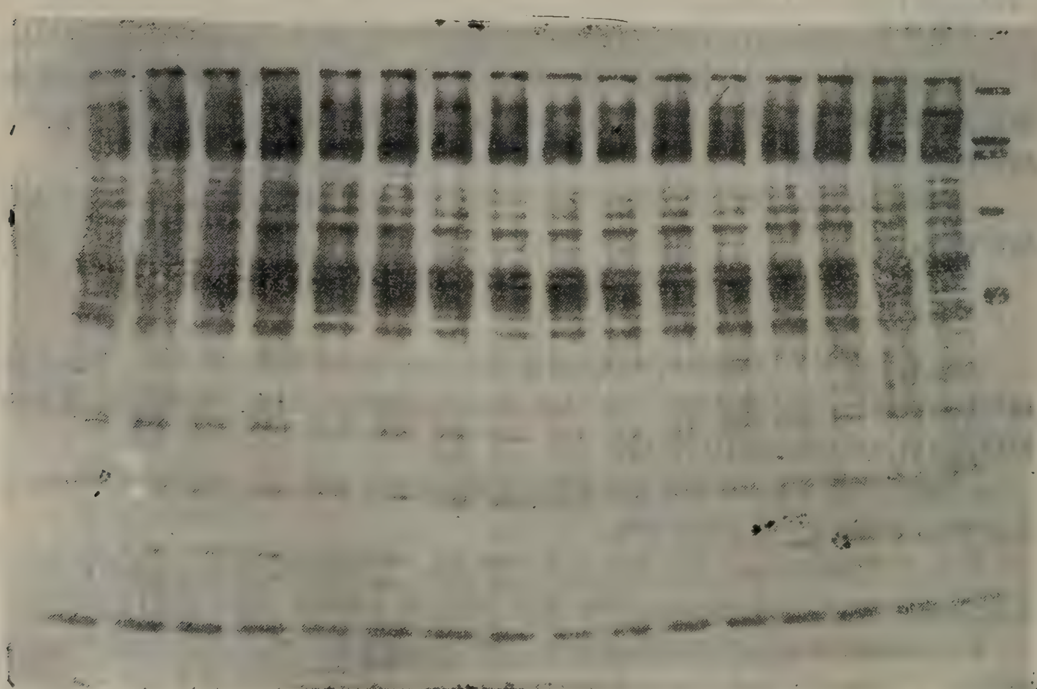


图 19.2 聚丙烯酰胺凝胶中蛋白质的考马斯亮蓝染色。除第一行为分子量标准外，余皆为同样的样品。

要使用屏蔽并放在 －70℃ 中，制片[注释(8)]。

注释

(1) 12.5% 的胶浓度是一个适宜的起点，因为它对分子量在 50 000 道尔顿范围内的蛋白质是有效的。16%(32ml 的 30% 丙烯酰胺)对于 10 000—30 000 道尔顿是合适的，而 8%(30% 丙烯酰胺/双丙烯酰胺 16ml) 可用于分子量 80 000 道尔顿的蛋白质。其它组分和体积仍保持一样。为了对一个广范围的蛋白质大小取得最佳的分离，可以用 8% 和 16% 两种浓度的丙烯酰胺溶液利用梯度仪做一个从 8% 到 16% 的线性梯度胶，胶液以 3ml/min 的流速通过一个用胶布固定的毛细管灌入胶板中，从底部到灌满需要 20 分钟。注意：如要制备梯度胶时，为了合适地灌满这块胶，每种胶溶液仅需配 30ml（原体积的 1/2)。丙烯酰胺是一种神经毒；操作时需小心并戴手套。同样也不要吸入粉末状的丙烯酰胺。

(2) 操作样品和凝胶时戴手套可防止污染。如果样品有放射性，操作试剂、凝胶和缓冲液时也要如此。

(3) SDS 在胶缓冲液中的终浓度是 0.1%。

(4) 样品可以是多种来源的蛋白质的水溶液。

(5) 要进行考马斯亮蓝染色，可接着进行步骤 10 和 11，然后加 300ml 0.2% 考马斯亮蓝的醋酸/甲醇/水(10:50:40)溶液。保温 4 小时或更长的时间。重复步骤 10 和 11 三次并不时进行混合，对胶脱色(褪去背景的颜色而谱带仍然显色，可以用一个 Hoefer 活性炭脱色器)。最后的漂洗步骤是在 10% 的醋酸中并使胶膨胀，接着在干胶前浸泡在 10% 甘油溶液中。

(6) 如果想要用荧光谱来增加 ^{3}H、^{14}C 或 ^{35}S 的放射自显影的敏感性，那么可以使用购自 NEN 的 Enhance 或 Enlighten。遵循产品说明书：在此溶液中振摇 30 分钟，然后干胶。

(7) 胶干燥的时间可以变化，视凝胶的厚度和真空强度而定。

(8) 暴光时间取决于胶中存在的标记蛋白量。详情参见 20-5。

参考文献

Laemmli, U.- K., *Nature* 227: 680, 1970.
Mahadik, S. P., Korenovsky, A., and Rapport, M. M., *Anal. Biochem.* **76**: 615, 1976.

19-3 蛋白质印迹法

提要

此方法可使研究者通过用特异抗血清结合的方法鉴定经SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳分离的特定蛋白质。在丙烯酰胺凝胶上被分离的蛋白质被转移到 NC 滤膜上并用抗血清培养。第一抗体特异地与其抗原决定族结合，而这个结合的抗体可用第二抗体或其它成分检测，像[^{125}I]-Protein A 或生物素标记的羊抗 IgG。

实验所需时间

电泳转移：2 小时或过夜
杂交和显示：7 小时

特殊装置

电泳转移装置 [注释(1)](例如 BioRad、Hoefer、E-C 装置)

塑料袋封口机

振荡器

试剂

0.2% 氨基黑染料,溶于 7% 醋酸

NGS (正常羊血清),56℃ 加热 60 分钟灭活,

通过 0.22μm 滤纸过滤

转移缓冲液

Tris 碱 12g

甘氨酸 57.65g

水 4L

在 Tris 和甘氨酸溶解后,加入 1L 甲醇,

用 HCl 调 pH 至 8.3

脱色缓冲液(必要时选用)

30% 甲醇和 10% 醋酸溶于水

印迹缓冲液

5%(w/v) Carnation 脱脂奶粉溶于 PBS (也称 BLOTTO 缓冲液)

磷酸盐缓冲液 (PBS)

PBS-Tween 缓冲液

0.05% Tween-20 溶于 PBS

(2.5ml20%Tween-20 溶于 1L PBS)

第一抗体: 为对感兴趣的蛋白质制备的抗血清,这可以是单克隆或多克隆抗体

第二抗体:

生物素标记的羊抗第一抗体种属的 IgG (Vector Labs) [注释(2)]

抗生物素蛋白-辣根过氧化物酶 (HRP)

(Vector Labs)

底物

30% 过氧化氢用水稀释到 1%(1:30)

颜色指示剂贮存液

4-氯-1-萘酚 (3mg/ml 水)

方法

实验准备

制备蛋白质分离用的聚丙烯酰胺-SDS 凝胶(见 19-2)。

得到针对感兴趣的蛋白顺序的抗体。

蛋白质印迹法

1. 聚丙烯酰胺凝胶中的蛋白质电泳转移到 NC 滤膜上。

a. 在转移缓冲液中漂洗凝胶和滤膜。在光滑的平面上把 NC 滤膜紧贴凝胶。为在

胶上铺平滤膜,用 5ml 玻璃吸管滚动除去所有的气泡。

b. 用一张 3MM 的滤纸(用转移缓冲液预先弄湿)把胶/NC 滤膜包上形成一个三明治。保持湿度和避免气泡。

c. 按制造厂的说明，把纸/胶/滤膜/纸的三明治放在电泳转移装置中。凝胶面向负极。

d. 放入缓冲液室并灌入缓冲液将胶覆盖。

e. 按照制造厂的说明,接通电源并进行电泳转移[注释(3)]。

f. 转移完成后,从槽中移走滤膜和凝胶。弃去凝胶。

2. 将滤膜在氨基黑染液中短暂漂浮，直至分子量标准显示出来。标明分子量标准的位置。

3. 在 100ml 水中短暂漂洗 NC 滤膜。必要时可用脱色液。

4. 滤膜在印迹缓冲液中 37℃ 放置 1 小时。

5. 室温下在 PBS-Tween 缓冲液中漂洗 1 小时。

6. 用封口机将滤膜封在塑料袋中,应尽可能地使其密封,保持小的内体积。

7. 剪开袋中的一角使之成为缓冲液的注入口,用透析夹封住开口处。

抗体反应

8. 混合:

100μl NGS

抗体(稀释度将随抗体而变化)[注释(4)—(6)]溶于 10ml 印迹缓冲液

加到有滤纸的袋中,室温下放置 2 小时(或 4℃ 过夜)并振摇[注释(7)]。

9. 滤膜在浅盘中用 PBS-Tween 缓冲液 75ml 漂洗，共进行 4 次,总体积 300ml，漂洗 30 分钟以上。

10. 加生物素标记的羊抗兔 IgG(40μl 溶于 10μl 印迹缓冲液和 100 ml NGS 中)至袋中[注释(8)—(10)]。室温下放置 1 小时并振摇。

11. 漂洗，同步骤 9 [注释(11)]。

12. 加入抗生物素蛋白-HRP (40μl 溶于 10ml 印迹缓冲液和 100μl NGS 中),室温下放置 30 分钟,并振摇。

13. 漂洗，同步骤 9。

14. 配制颜色试剂/基质。混合颜色指示剂贮存液 3ml、PBS 9ml。加入 1% 过氧化氢 150μl。立即使用。

15. 室温下振摇直至显示出紫红色、背景开始被察觉(1—10 分钟)。

16. 转移滤膜到另一个装有水的容器中漂洗,阻止颜色加深。空气干燥。保存于塑料袋中,置暗处。

注释

(1) 在不同的制造厂家中,转移电泳的装置和操作条件变化很大。

(2) 有许多用抗血清检测特异蛋白质的方法。这里介绍的例子如下:

兔抗体＋羊抗兔-生物素＋抗生物素-HRP＋ 颜色-过氧化物

这能代替其它类型的适当的生物素标记的第二抗体。另外的方法也可用其它的指示系统结合到第一或第二抗体上。

(3) 典型的条件是 0.1A 电泳 16 小时,或 0.7A 电泳 1 小时。

(4) 见注释[2]。

(5) 试验多种稀释度以便从经验上确定适宜的抗体浓度。

(6) 对照血清或未经免疫的血清作为空白对照。

(7) 所有步骤中的振摇是为了有效地混合(在振荡器中)。

(8) 见注释(2)。

(9) 见注释(5)。

(10) 能用 ^{125}I 标记的第二抗体或蛋白 A 代替生物素标记的第二抗体。

(11) 如果用 ^{125}I 标记,干胶后对 X 线片曝光,不必要进行第 12 步操作。

参考文献

Johnson, D. A., Gautsch, J. W., Sportsman, J. R., and Elder, J. H., *Gene Anal. Tech.* **1**: 3, 1984.

Towbin, H. H., Staehelin, T., and Gordon, J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4350, 1979.

19-4 凝胶电泳的蛋白质或 RNA 的银染法

提要

本节介绍了一个灵敏、高效地显示聚丙烯酰胺凝胶上 RNA 或蛋白质谱带的方法。介绍两种方法:使用试剂盒(例如 BioRad 或 NEN)或一种比较经济的实验室方法。

实验所需时间

2—3.5 小时

试剂

试剂盒方法

包括有氧化剂、银染色试剂和显色剂的银染色
试剂盒 (Biorad 或 NEN)
40% 甲醇
10% 乙醇
5% 和 10% 的乙酸

非试剂盒方法

固定剂 1:50% 甲醇和 7.5% 乙酸的溶液
固定剂 2:5% 甲醇和 7.5% 乙酸的溶液
固定剂 3:10% 戊二醛
显色剂
  0.05% 柠檬酸
  每毫升 0.05% 柠檬酸溶液中加入 5μl 37% 甲醛

染色剂：配制 250ml

0.09mol/L NaOH 53ml

NH_4OH（浓）3.5ml

非常缓慢地加入：$AgNO_3$ 溶液(20g 溶于 100ml 水中)8ml；边加边摇，用水补足体积至 250 ml

方法

实验准备

对于 RNA，在电泳仪上进行聚丙烯酰胺凝胶(1.0mm 厚)电泳[注释(1)]。对于蛋白质，像 19-2 指出的那样，在 1.0—1.5mm凝胶上电泳。每个样品槽中加 10—100ng 的样品。

试剂盒方法(所有步骤都在室温下振荡完成)[注释(2)]

1. 电泳完成后，把胶放在盛有 400ml 40% 甲醇的塑料盘中。按下表中列出的时间、体积和溶液更换盘中的试剂[注释(3)]：

溶液	体积 (ml)	蛋白质 染色时间(分钟)	RNA 染色时间(分钟)
40% 甲醇/10% 乙酸*	400	60	30
10% 乙醇/5% 乙酸*	400	30	15
10% 乙醇/5% 乙酸*	400	30	15
氧化剂(盒中)	200	10	5
水	400	10	10
再用水		2 次	1 次
银染色试剂(盒中)	200	30	20
水	400	2	10
显色剂(盒中)	200	1	0.5
显色剂	200	5	5
显色剂	200	5	5
5%乙酸(终止液)	400	5	5

* 在 RNA 染色的前三步中不用乙酸。

2. 在最后三步操作中谱带将被显出。谱带显出的时间可能不同；在背景变成比谱带深之前加入终止液。终止反应后，凝胶在 400ml 水中漂洗[注释(4),(5)]。此时可对凝胶进行拍照或用于其它分析。凝胶可以保存在密闭的塑料袋中。

适合于蛋白质染色的实验室非试剂盒方法

3. 在下列溶液中进行凝胶染色：

溶液	体积 (ml)	胶厚 0.75mm 时间	胶厚 1.5mm 时间
固定剂 1	400	20	30
固定剂 2	400	20	30
固定剂 3	400	20	30
用大量体积的水漂洗 2—3 次，最好是在 1—2 L的水中过夜。这很重要。			

续表

溶液	体积(ml)	胶厚0.75mm	胶厚1.5mm
		时间	
染色剂	200	20	10
仔细观察；如果胶开始变为棕色，立即进行下一步操作。			
水洗	500	5	5
显色剂	250	5	5
约15分钟。显色直至谱带可见，如要缓慢地显色，用水补足体积至400ml。			
水洗	400	5	5
重复上步操作。			
在大量水(例如2L)中洗，在2小时以上的时间内换水2次[注释(6)]。			
需要时可照相或密封在塑料袋中。			

注释

(1) RNA 胶的配制，除了胶中不用 SDS 和用 1×TBE 做电泳缓冲液之外，其余同 19-2。胶是 5% 丙烯酰胺和 8mol/L 尿素溶在 1×TBE 中，如 16-9 所叙。使用 16-9 介绍的加样液。电压 400V 进行电泳。

(2) 按照试剂盒附有的介绍和步骤说明。这里给出的时间和体积是常用的。

(3) 除了边缘以外，不要用手触摸凝胶，甚至旧的手套也会将手指印留在胶上。当换溶液时用一个蝇拍似的工具将胶捞出。

(4) 如果有必要进一步显色可再用一批显色剂。

(5) 如果染色过深，可使用还原剂褪色(购自 Kodak、Biorad、Farmers 等)。如果染色不足，再试染一次：用水漂洗并由染色的步骤开始。

(6)见注释(4)和(5)。D. Reed 为非试剂盒方法提供了技术资料。

参考文献

Oakley, B. R., Kirsch, D. R., and Morris, N. R., *Anal. Biochem.* **105**: 361, 1980.
Merril, C. R., Goldman, D., and Van Keuren, M. L., *Meth. Enzymol.* 96: 230, 1983.

(郭燕捷译　姚志建校)

第20章 常规方法

20-1 DNA/RNA 抽提和沉淀

提要

使用前为了从 DNA 或 RNA 样品中除去蛋白质和污染物，用 SS-苯酚/氯仿抽提蛋白质,然后用乙醇沉淀。这个方法是本书许多方法中的一部分。

实验所需时间

约 1 小时

试剂

SS-苯酚
氯仿
无水乙醇和 80% 乙醇
3mol/L 醋酸钠 pH7 用于 DNA
3mol/L 醋酸钠 pH6 用于 RNA
tRNA，酵母，10mg/ml

方法

实验准备

制备待抽提的 DNA 或 RNA 样品。样品常以小体积存于 1.5ml 微量离心管中,但也可以大体积存于大试管中。样品必须溶解在已知体积的水溶液中。

SS-苯酚/氯仿

1. 每份样品中加入 1 体积 SS-苯酚和 1 体积氯仿,振荡混匀[注释(1)]。
2. 每管离心 1 分钟[注释(2)]。
3. 将上面水相层转移至新管内。在吸之前若把试管倾斜至 45° 角，其效果更好。弃去低层有机相[注释(3),(4)]和界面上的物质。

DNA 或 RNA 的乙醇沉淀

4. 由步骤 3 得到的水相,按其 1/10 体积的量加入 3 mol/L 醋酸钠(对 DNA用 pH7,对 RNA 用 pH6),使醋酸钠终浓度为 0.3mol/L[注释(5),(6)]。
5. 于试管中加入至少 2.5 体积 95% 乙醇,放置干冰上至少 10 分钟或在 −20℃ 贮存几小时。在微量离心机中,4℃ 离心 10 分钟[注释(7)]。
6. 仔细弃去上清液，不要搅乱沉淀物， 去除剩余的盐份，用 300μl 或更多体积的

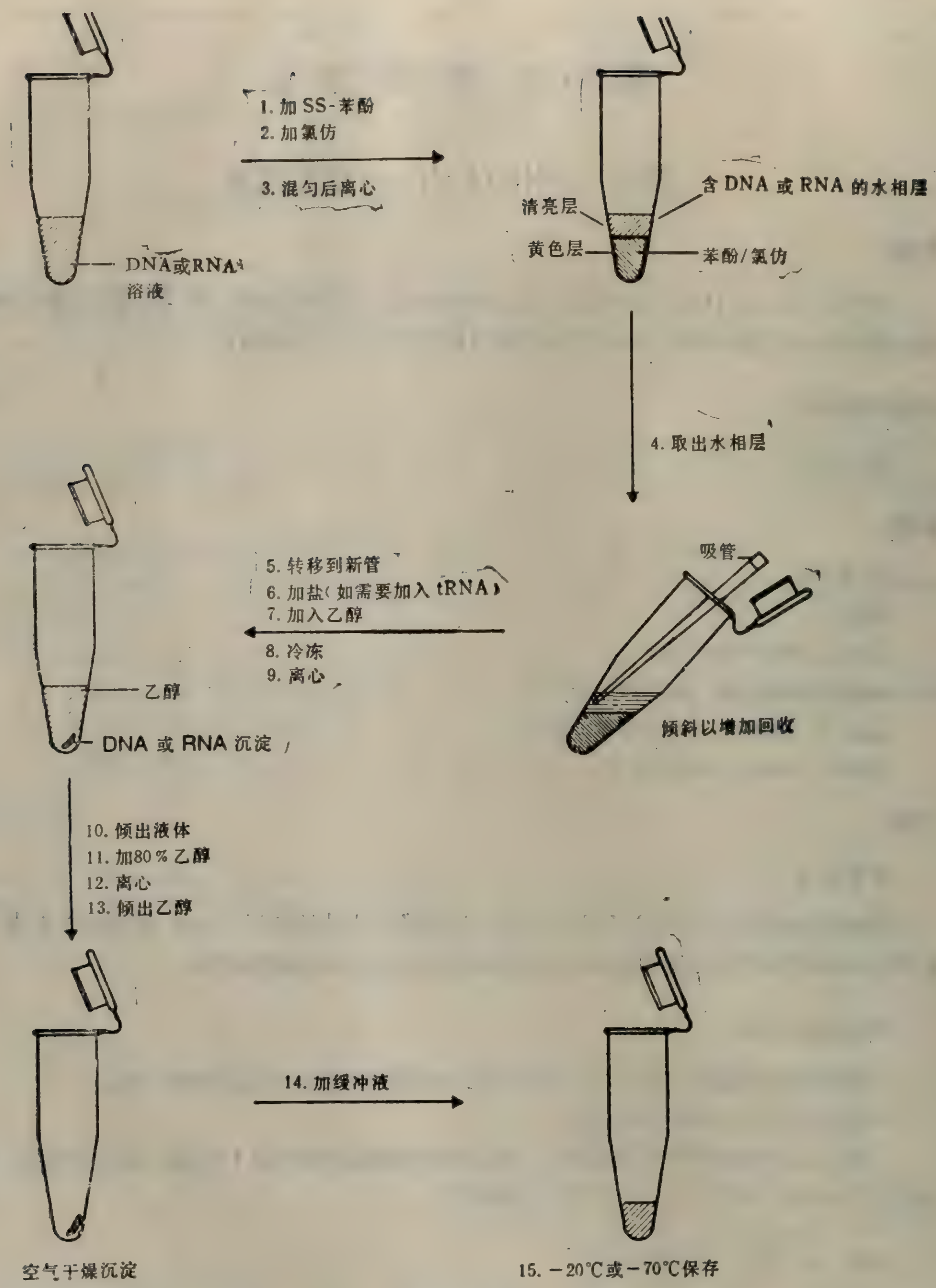


图20.1 DNA 或 RNA 的纯化。用 SS-苯酚和氯仿抽提样品，去除杂质(如蛋白质)，然后用乙醇沉淀核酸。

80% 乙醇洗沉淀物，振荡混匀。

7. 微量离心机中，4℃ 离心 2 分钟。

8. 弃去上清液，空气干燥沉淀物[注释(8)]。

9. 按要求悬浮沉淀[注释(9)]。

注释

(1) 轻轻混匀以避免大片段 DNA 断裂,通过反复轻轻倒位使样品混合,不要振荡。

(2) 微量离心应在 4℃ 冷室中进行。对大量样品,可在大离心管中于 4℃ 10 000×g 离心 5 分钟。

(3) SS-苯酚是用盐和水饱和的,抽提中将位于底层 (SS-苯酚在贮液瓶中位于顶层),同时它带有黄色,易辨认。某些操作在这步中需要加入小量的异戊醇。每次抽提都可能损失掉少量水相层。可按要求调整体积。 某些操作要求第一次抽提用 1 体积 1:1 的 SS-苯酚和氯仿混合液抽提, 然后用氯仿抽提。

(4) 大量样品可取 450μl 左右转移到 1.5ml 微量离心管中。另一种方法,可在较大的有盖的试管中(如 10—15ml)用乙醇沉淀大量样品。

(5) 用 1/10 体积的 5mol/L NaCl 取代醋酸钠。当核酸浓度低时, 盐对形成核酸沉淀是必需的。醋酸钠的缓冲能力可能比 NaCl 强。

(6) 如果 DNA 或 RNA 浓度低于 1μg/ml,加入酵母 tRNA载体(如 10μg/μl)将通过促进沉淀而使回收增加。假如影响以后的步骤,小心不要用 tRNA 载体。

(7) 在离心中将使冷冻乙醇混合物融解。如果核酸浓度在原始溶液中足够高 (如高于 10μg/ml),在冰浴(0—4℃)放置 10 分钟后核酸沉淀即生成。如果浓度较低时,则需在干冰中孵育。

(8) 较大的 DNA 片段(如基因组 DNA 或 λ 噬菌体)不应完全被干燥,另一些样品可用真空蒸发仪完全干燥。

(9) DNA 悬液常存于 TE 缓冲液中。沉淀物贮存于 －20℃ 时较稳定。为了增加稳定性,RNA常贮存于水或 80℃ 乙醇中。－70℃ 贮存RNA。

参考文献

Kirby, K.S., *Biochem. J.* **64**:405, 1956

20-2　塑料袋的密封

提要

对于杂交来说[注释(1)],这是一项快速、简单和有效地密封袋中膜片的技术。

实验所需时间

5 分钟

特殊设备

塑料袋密封机(如 Sears、Krups)

可热封的塑料袋(如 Kapak)

方法

实验准备

准备印迹用的 NC 膜片和杂交缓冲液[注释(2)]。

步骤

1. 将膜片平放入可热封的聚乙稀塑料袋内[注释(3),(4)],加不含探针的杂交缓冲液

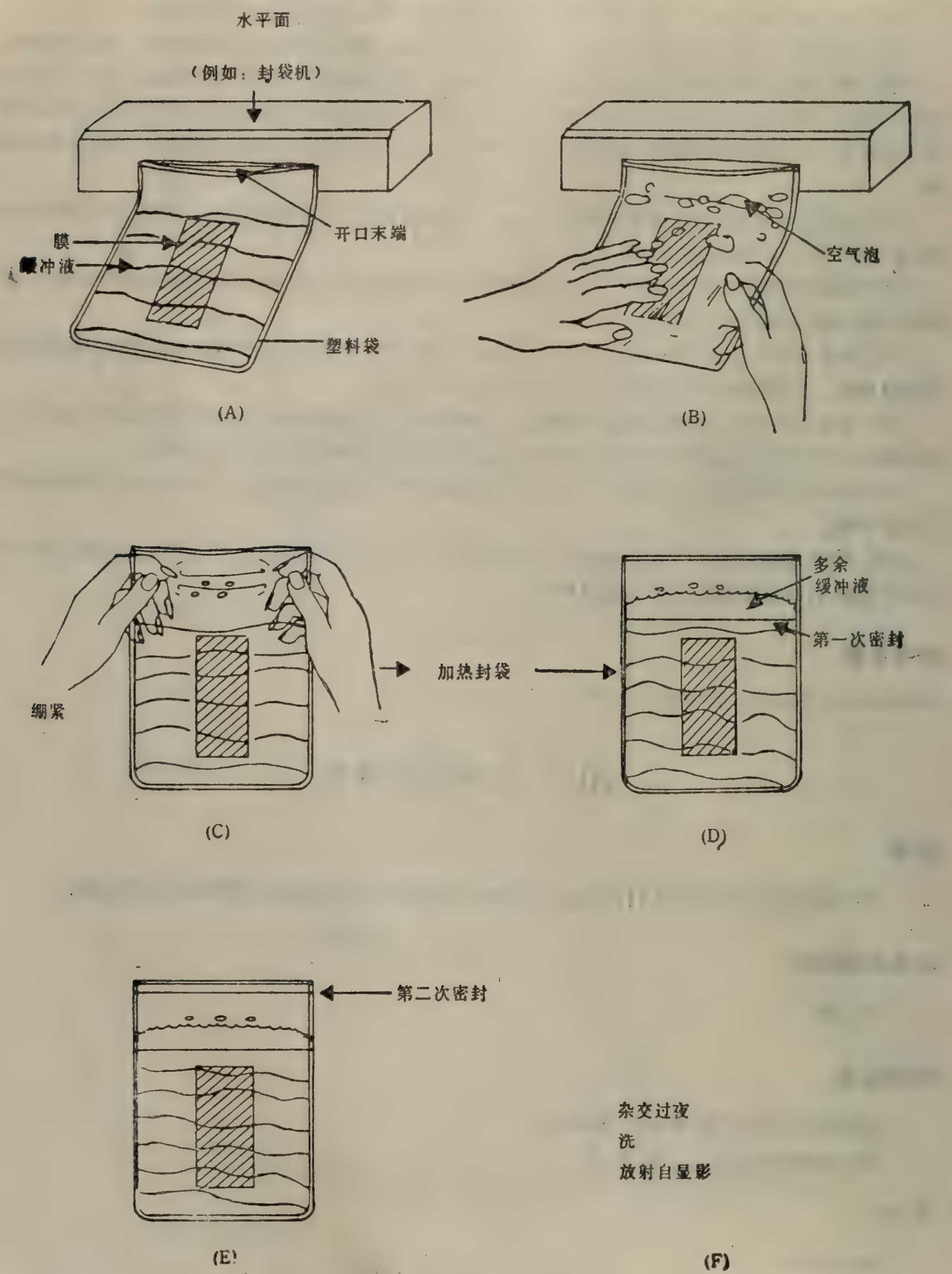


图 20.2 塑料袋封口流程图。

浸没膜片,至少预杂交几分钟,然后加入含探针的杂交混合液。挤压袋子使所有气泡和大部分小气泡从液体中排出,将膜片均匀浸湿,封袋口,使液体保留在内。有关步骤见图 20-2。

2. 把袋子平放在水平面上,开口一端向上折成直角,找出垂直水平的面。

3. 液体均匀地在膜片的周围,从袋子开口端向上排除气泡。

4. 把手放在袋子一侧的上缘,绷紧袋子并将袋子竖起来使气泡移到顶端。

5. 提起袋子,将袋子一侧的边缘放在热密封机上,在靠近液体顶端边缘进行密封。有少量液体封在外面。

6. 在袋子顶端边缘进行第二次密封以保存液体。

7. 现在袋子完全密封好,准备保温。

注释

(1) 这项技术是很有用的,似乎比实际所写的更简单。

(2) 杂交缓冲液含有高比放射性,为了防护必须带手套。

(3) 可热封的塑料袋有商品出售, Kapak Corporation 的 Stoch-pack #405 袋子可容纳 20×20 cm NC 膜片。

(4) 为了预杂交,膜片要浸湿(膜片是在皿中浸湿,而不是在袋中浸湿的),浸湿的膜片很难装入袋中。另一种方法是,预杂交在袋内进行,剪掉袋子的一个角,注入更多的含放射性探针的缓冲液,然后夹住或密封住这个袋角。

20-3 光密度测定

提要

此方法利用紫外分光光度计来测定 DNA 或 RNA 浓度,或用可见光分光光度计测量悬液中细菌数量。紫外分光光度计需使用石英杯。可见光分光光度计使用塑料或玻璃杯。另一种方法即溴乙锭琼脂糖板方法在小量核酸测量时是有用的,曾在 11-3 步骤 5 中提到过。

实验所需时间

15 分钟

特殊设备

分光光度计

方法

溶液中 DNA 或 RNA 浓度的测量

1. 取 5μl DNA 样品或 4μl RNA 样品加到 995μl 水中[注释(1)],混匀后,转移到分光光度计测量杯中。

2. 用 1ml 水调整分光光度计零点。

3. 将样品放入分光光度计内,[注释 (2)]在波长260nm 时读出光密度值(O.D.)。

4. DNA 或 RNA 浓度 ($\mu g/\mu l$ 样品)将是所读到 O. D. 值的 10 倍。例如,当稀释样品在 260nm 时的 O.D. 是 0.2 时,其原液中DNA 或 RNA 浓度是 $2\mu g/\mu l$[注释(3)]。

5. 如果需要评价样品纯度,可在 280nm再读第一次O.D.值,来测量 260nm波长和 280 nm 波长时 O. D. 的比值。如果比值接近 2,吸收可能是由核酸所致。如果比值小于 1.6,样品中可能有蛋白质或其它紫外吸收物,最好用 SS-苯酚/氯仿重新抽提,并用乙醇沉淀(见 20-1)。

细菌生长过程中密度的测量

6. 用培养液调整分光光度计的零点(常用 LB 培养基)。

7. 取 1ml 在此培养基中生长的细菌样品,在波长 600nm 处测量O. D.值[注释(4)]。

8. O. D. 值在 1.0 以上表明细菌生长超过指数期 [注释 (5)], O. D. 值在 0.2-1.0 之间表明细菌正处于指数生长期[注释(6)]。

注释

(1) DNA 或 RNA 在体积上的差异与消光系数有关。DNA O.D. 值为 1.0 时,浓度为 $50\mu g/ml$; RNA 或单链 DNA O.D. 值为 1.0 时,浓度则是 $40\mu g/ml$。

(2) 使用测量杯前应彻底洗净。

(3) 如果 DNA 或 RNA 样品浓度小于 $0.1\mu g/\mu l$ 时, O. D. 读数的可靠性太低。用稀释度小的样品,并作相应校正。

(4) 这是测量光散射。

(5) 细胞可能在融合状态发生溶解。根据 O. D. 值来确定细菌生长速度、指数期和停滞期。

(6) 接种的培养液要几小时后才达到 O. D. 为 0.1。典型地在对数期的细胞,每 30 分钟增加 1 倍。而许多方法中要求使用中期指数相的细胞。

20-4 凝胶照相或放射性自显影

提要

此方法在琼脂糖凝胶处理前就可记录下 DNA 或 RNA 在胶上所处位置 (带)。溴乙淀(红色荧光)与 DNA 或 RNA 结合后在紫外线激发下也可以被记录下。这些方法同样可以用于X 线片和聚丙烯酰胺凝胶拍照。

实验所需时间

5—10 分钟

特殊装置

照相装置[如 Polaroid MP-4 57(ASA 3000) 型底片]
适合于溴乙锭的滤光片(如 Wratten #9 22A)
紫外线照射设备
X 线片曝光盒

方法

凝胶照相

1. 把凝胶放在紫外线箱上，打开可见聚光灯或室内灯。

2. 把尺子放在凝胶边缘处作为距离标记。

3. 取下照相机上的红色滤光片[注释(1)]。调整焦聚[注释(2)]，使照相机在凝胶或尺子数标上聚焦。

4. 把暗盒放在镜头的后面，再把红色滤光片放在镜头前方位置。

5. 带上墨镜以防紫外线对眼睛的伤害。打开紫外灯，关上照明灯或聚光灯。

6. 手动打开快门 2—3 秒[注释(3)]。

7. 取出底片，按说明冲片。

X线片或聚丙烯酰胺凝胶照相

8. X线片放在可见光下曝光，照相按步骤 3、4、6 和 7，但不用红色滤光片。

注释

(1) 红色滤光片是 Kodak Wratten 9 或 22A，或者相类同的滤光片。

(2) 参阅你的照相机说明书。

(3) 曝光时间和光圈设置可以变动，取决于胶片的型号，所用的速度以及区带的强度，通过试验决定正确的曝光条件。

20-5 放射自显影术

提要

放射自显影用于测定膜片或凝胶上放射性物质的位置。广泛应用于本书中所提到的许多实验中。

实验所需时间

根据曝光时间而定。每次开始或冲片为 15 分钟。

特殊装置

冲洗X线片系统——自动冲片机(如 Kodak X-OMAT) 是一类节省时间、减小差错并可连续操作的设备。但也可以手工冲片。有关手工冲片的详细资料可以从随底片提供的说明书中得知。

X线片暗盒(如 Wolf X-Ray Corp)

Geiger 计数器

试剂

放射自显影片用一般的X线片(如 Kodak XAR-5 或 XRP-1)

增感屏(如 Du Pont Gronex)

^{14}C 或 ^{35}S 标准

方法

有关放射自显影一般注意事项

1. 在黑暗中把带有放射性的膜片或凝胶放在未曝光的X线片下面，并将X线片暗盒封存一段时间，进行曝光后，在黑暗处取出片子进行冲洗。

2. 在绝大多数情况下样品都带有^{32}P，增感屏被放在X线片的上面，使X线片夹在增感屏和放射性样品之间。用增感屏时，在 $-70℃$ 条件下进行曝光。增感屏降低分辨率，但可以增强信号强度(例如：使^{32}P 提高10倍)，这对于低水平放射性信号特别有用。当需要高分辨率时，如用于序列分析凝胶(见16-8和16-10)，可在室温下曝光，不用增感屏。

3. XAP-5 和 XRP-1 两种片子都可以使用。 XAR-5 曝光速度快，但颗粒较粗；而 XRP-1 曝光速度约为前者的1/3，但颗粒较细。

4. 有些具有高放射性比活的样品(如含 S1 探针制备物做的微型胶)需要的曝光的时间少于10分钟。在黑暗处迅速将片子放在凝胶上(凝胶被干净的塑料纸包裹着)[注释(1)]，把片子的一角与凝胶的一角对应上。用玻璃片盖在片子上，等待20—60秒。这一步骤可用慢速的 XRP-1 片。迅速取片子进行冲洗。

5. 如果在 $-70℃$ 条件下曝光，打开暗盒前将暗盒恢复到室温，以防止冷凝。另一种方法是迅速打开暗盒，在冷凝现象出现前，取出片子迅速冲洗。不要使用潮湿或冷的暗盒。重新使用前要将暗盒干燥。

6. 用带有^{35}S 墨迹的粘附性小标签对膜片和凝胶做标记，这将有助于使放射自显影片子在曝光时的位置易于辨认[注释(2)]。

注释

(1) ^{32}P 样品一般用干净的塑料带包裹，推荐用 Saran Wrap。这可使暗盒与增感屏免于被穿透性放射性污染。

(2) 干净的塑料包裹物可阻断大量的^{35}S 信号。如果应用^{35}S 为放射性源的话，除非样品的放射性足以能穿透塑料包裹物，否则就不应使用它。

20-6 细菌培养平板的制备

提要

本方法用于制备提供细菌集落生长的固化琼脂培养平板。在某些情况下，为了形成噬菌斑，这些底层为琼脂的平板上再铺上含细菌的上层琼脂。有两种类型培养基的琼脂：用于绝大多数细菌生长的 LB 琼脂和用于 JM103，JM107 或 JM109 的基本琼脂。

实验所需时间

1小时

特殊装置

高压灭菌锅

试剂

LB 板

细菌培养用胰蛋白胨(如 Difco)

细菌培养用酵母抽提液

琼脂

NaCl

1mol/L NaOH

氨苄青霉素 50mg/ml (无菌过滤)

四环素 12.5mg/ml 溶于 50% 乙醇(无菌过滤)

含 IPTG 和 Xgal 的 LB 氨苄青霉素板(用于 pUC 插入筛选,见 15-4)

胰蛋白胨

酵母抽提液

琼脂

NaCl

1mol/L NaOH

氨苄青霉素 50mg/ml (无菌过滤)

2% Xgal 溶于 DEM

0.1mol/L *IPTG* (无菌过滤)

基本琼脂板

琼脂

0.1mol/L $CaCl_2$ (无菌过滤)

1mol/L $MgSO_4$ (无菌过滤)

Na_2HPO_4

KH_2PO_4

NaCl

NH_4Cl

维生素 B_1 100μg/ml (无菌过滤)

20% 葡萄糖(无菌过滤)

方法

1. LB 琼脂(含或不含抗生素;含或不含 IPTG 和 Xgal)

a. 制备 1 000ml LB 琼脂平板：加水至 950ml[注释(1)]。

胰蛋白胨 10g

酵母抽提液 5g

NaCl 10g

用 1mol/L NaOH 将 pH 调至 7.4

加入 15g 琼脂

加水至 1 000ml，高压灭菌。

冷却至 50℃，按要求加入抗生素（1ml 1 000 倍浓缩液）[注释(2)]。

b. 如果需要，加入 5ml 2%Xgal 和 0.1mol/L IPTG（15-4）。

c. 倾入水平放置的培养皿中。90—100mm 的平皿加入 25ml（用玻璃吸管加），培养基厚度应在 0.3cm 左右[注释(3)]。

d. 冷却凝固。

2. 基本琼脂板

$Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 6g

KH_2PO_4 3g

NaCl 0.5g

NH_4Cl 1g

加 950ml 水，待盐溶解后，用 10mol/L NaOH 将 pH 调至 7.4。加入 15g 琼脂，高压灭菌。冷却至 60℃。加入下列无菌溶液：

10ml 20% 葡萄糖(过滤灭菌)

1ml 0.1mol/L $CaCl_2$（高压灭菌）

1ml 1mol/L $MgSO_4$（高压灭菌）

50μl 100μg/ml 维生素 B_1

用无菌水将体积调至 1 000ml。按上叙步骤 c 注入各平皿内。

3. 贮存。制备好的平板应盖好以保持无菌，置4℃直到使用。不要粘贴边缘，这样可能导致污染。使用前应恢复到室温。

注释

（1）用纯的去离子水是重要的。用高压灭菌的玻璃皿或无菌塑料培养皿。

（2）1 000 倍浓缩的四环素原液（12.5mg/ml 溶于 50% 乙醇或氨苄青霉素原液(50mg/ml 溶于水中)。经过滤除菌后加入培养基中。浓缩的原液可避光贮存于 －20℃。

（3）通常细胞在 90 或 100mm 平皿中生长。其它大小的培养皿也能使用；可相应调节体积。

20-7 噬菌体的滴定和铺板

提要

当细菌在顶层琼脂中生长时，将以融合状形成一片。如果把噬菌体加到有细菌层的平板上，靠近细菌的噬菌体将感染细菌，最终溶解掉被感染的细菌。由于感染和溶解的反复进行，一个噬菌体在一个很小的区域内将生成 10^7 噬菌体，它们溶解周围的细菌并形成一个清亮的噬菌斑。每个原始噬菌体都代表一个噬菌斑生成单位（pfu）。

通常希望对一份纯化样品中的噬菌体进行计数或滴定。为此，将小量样品加到有细菌层的平板上，计数噬菌斑形成的数目，并计算出每毫升样品中的 pfu。通常，无法计数

全板的噬菌斑，但在平板上划格标记后可以计数每方格中噬菌斑数，由此计算出加入到培养皿中的每体积中的噬菌体数。

一般按下列步骤进行噬菌体的滴定和铺板：

1. 制备溶液（如 LB、麦芽糖、$MgSO_4$、TMG、顶层琼脂，见 13-5）。当板上细菌生长到适合于噬菌体滴定时（如用于EMBL 3 的 LE392 细菌）接种 50ml 无菌 LB 培养基加 1ml 含单一细菌集落的 20% 麦芽糖。细菌生长到在波长 600nm时 O. D. 值为 0.5，3 000 ×g 离心 10 分钟，收集细菌。用 25ml 无菌 10m mol/L $MgSO_4$ 制备悬液，这些活化的细菌 4℃ 可以贮存至少一周。

2. 用 TMG 缓冲液在一系列微量离心管中对1μl 噬菌体作一系列 10 倍稀释。包括样品中所期望的噬菌体滴定范围。取 1μl 稀释的噬菌体加到无菌的 12 × 75mm 培养管中。用已知的每 1ml 含有一定量 pfu 的稀释液。许多噬菌体原液的滴度常在 10^9—10^{11}pfu/ml。

3. 取 200μl 活化的细菌加到每个培养管中。

4. 取 2.5ml 顶层琼脂加入每管中（冷却至 48—50℃，以防杀伤细菌）。

5. 立即倾入到培养皿的底层琼脂上。为了便于计数应使用底层带有方格刻度的平板。使用前必须将底层琼脂加热至室温或 37℃。

6. 在室温下放置 15 分钟待顶层琼脂凝固。

7. 把平板倒置，37℃ 保温过夜。

8. 噬菌斑将是明显的。必须在它们生长过密（即相互接触）以前进行噬菌斑计数。

9. 同样检查对照皿（即接种细菌而不加噬菌体）的噬菌斑数。对照皿不应有噬菌斑。

10. 以 pfu/ml 为单位计算原始样品中的滴度。这将决定在其它步骤及有效构建文库时需要多少样品（第 13 章和第 14 章）。

（黎　燕译　沈倍奋校）

第 21 章　特殊实验方法

21-1　转基因小鼠的培育

提要

转基因小鼠的产生是通过将一段克隆的 DNA 导入受精的小鼠卵细胞，随后让此胚胎发育直至出生和生长而得到的。DNA 是否成功地参入某种系，可在以后通过分析其子代的基因组 DNA 来得知。这一方法可以使特定的基因及调节成分的功能置于有复杂的发育和组织分化的整体动物中来进行检查。

第一步是将雌性小鼠中新鲜的受精卵取出，并洗涤这样的胚胎以准备注射。需要一个特殊的显微操作台系统。胚胎用一根微量移液管夹持固定，用另一根注射移液管将克隆的 DNA 注入雄性原核。将一组注射后的胚胎放在假受孕的雌性小鼠的子宫中。出生后筛选其基因组中克隆 DNA 的存在（如用小鼠尾部的 DNA 制品和 Southern 印迹分析）。

现在仅有少数几个实验室能成功地完成这种困难的操作。在能熟练地掌握这一方法前肯定会经历多次的实验和失败。

到目前为止已有一些功能性基因通过这一方法引入小鼠，其中包括癌基因和生长激素基因。在插入感兴趣的编码区的同时也插入调节顺序，则基因的表达可能被调节。另一些转入基因的插入隔断了宿主的基因，而引起功能性的改变。很可能被注射的每个胚胎将得到同样的一段 DNA，但随机地插入到基因组中不同的区域，因此可能发生表达的变化。注意：本方法需要管理动物的技巧和动物外科学的知识，也需要无菌培养技术和细胞的显微操作技术。

实验所需时间

第 1 天：4 小时用于准备动物
第 2 天：4 小时用于准备胚胎
　　　　6 小时用于注射胚胎
　　　　4 小时用于移植胚胎

特殊装置

倒置显微镜[40（物镜）×10（目镜）]和长聚光镜（如 Nikon）
显微操作台（2 个）（Leitz）和两个单独的仪器持器和操纵杆
解剖显微镜：一台普通的，一台由下侧经光纤维光源照明
移液管抻拉器（垂直）（D.Kopf Inst., Model 700/c）
压缩空气源
微型熔器（Microforge, de Fonbrune）

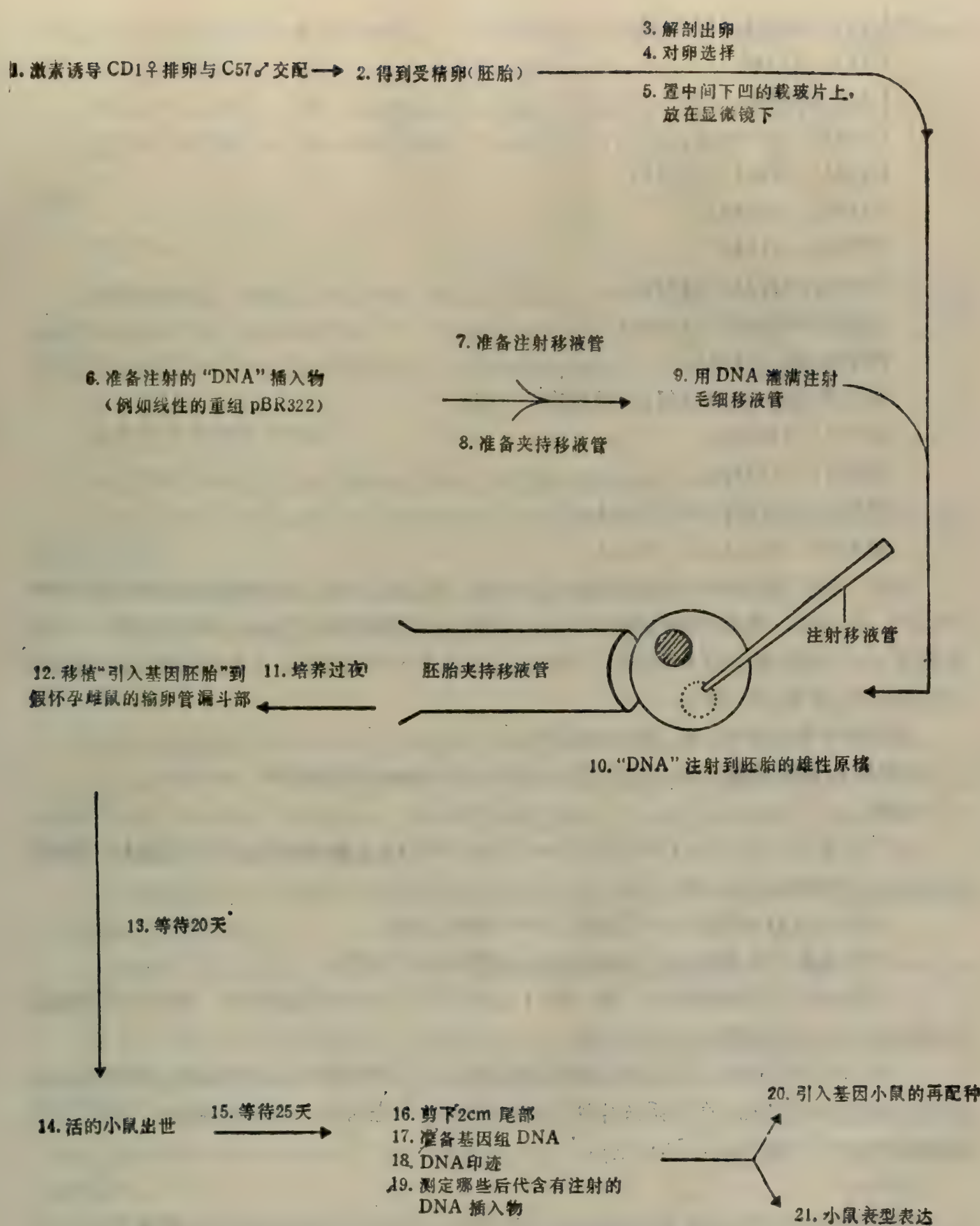


图21.1 转基因小鼠分析的流程图。

外科器械(包括修钟表的镊子)

可控制环境的培养室

试剂

Whitten 培养液 (100ml)

NaCl 0.514g

KCl 0.0356g

KH_2PO_4 0.0162g

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.0294g

$NaHCO_3$ 0.190g

葡萄糖 0.100g

乳酸钙 · $5H_2O$ 0.053g

乳酸钠(60%浆) 0.37ml

丙酮酸钠 0.0025g

牛血清白蛋白(最优级,无球蛋白) 0.4g

EDTA 0.0028g

HEPES 0.238g

青霉素 (10 000U/ml) 0.1ml

链霉素 (50mg/ml) 0.1ml

在每一组分都溶解在灭菌的去离子水中后,用已用 10ml 培养液涮洗过的 Millipore Sterifil System 将此培养基除菌过滤。将 90ml 除菌的 Whitten 培养基倒入一无菌的瓶子中,并向溶液中通入 5%O_2、5%CO_2 和 90%N_2 30 分钟。贮存(紧密加盖)在冰箱中直至使用(不超过 1 周)。

灭菌的平衡盐溶液(如, Hank 氏液)

DNA 注射缓冲液: 1mmol/L Tris-HCl, 0.1mmol/L EDTA, pH7.2

动物:

卵供给者为 CD-1(如 Charles River CD-1 Ha/Icr) 雌性小鼠, 3—4 周龄。用前让它们对光/暗周期适应一周。

养母小鼠为 8 周到 6 个月龄的 CD-1 雌性小鼠。

配种雄鼠为 8 周到 12 月龄的雄性 C57B1/6J 小鼠。

无生殖能力(输精管结扎)的 CD-1 雄鼠,在第 4 周结扎输精管。等待一个月观察其绝育情况,一直可用到 8—12 月龄。

将小鼠养在温度、湿度都可调节的环境中, 14 小时光照 10 小时黑暗,周期循环。动物可任意取食物和水。在此系统中所有的子代应当不是白的,否则就是因为"绝育"的雄鼠输精管结扎不成功。

药物:

怀孕母马的血清(如购自 Organon 的 Gestyl 或购自 Sigma 的促性腺激素)。在灭菌的平衡盐溶液中稀释到 50U/ml。分装贮存于 −20℃。

人绒毛膜促性腺激素 (Sigma)。在平衡盐溶液中稀释到 50U/ml。分装贮存于 −20℃。

戊巴比妥钠(贮存液, 2mg/ml H_2O) (Abbott Labs)

透明质酸酶,用时以 Whitten 培养液稀释到 50μg/μl。

硅油 (Dow 200, 粘度 50CS)或甲基硅 (50DC200 William, F. Nye. Inc.) 用时,

高压灭菌并对培养液平衡(1 体积油：7 体积Whitten 培养液)。每1ml平衡的油加 1μl 抗生素(青霉素/链霉素)。贮存于密封的灭菌容器中。

5%O_2、5% CO_2、90% N_2的混合气体，通过水(洗瓶)后用于环境培养箱中。

抗生素(青霉素，10 000U/ml，链霉素 50mg/ml)(GIBCO)

方法

实验准备

制取培养液。准备用于注射的 DNA。用限制性内切酶使质粒线性化后，用琼脂糖凝胶电泳提纯 DNA 并电洗脱。SS-苯酚/氯仿提取，乙醇沉淀。令完全干燥并以 1μg/ml 的比例再悬浮于 DNA 注射缓冲液中。用前离心以去除沾染的颗粒[注释(1)]。

准备用来收集卵的雌鼠

(也可用较多的不同时间排卵的小鼠，并以阴道栓塞测定阳性。)

1. 大约在暗周期中点前 12 小时注射怀孕母马血清 5U(于 0.1ml 内，腹腔注射)，使小鼠同步排卵。

2. 第一次注射后 48 小时，注射 5U 人绒毛膜促性腺激素 (0.1ml)。

3. 注射后将每只雌鼠与一只配种雄鼠置同一笼中过夜。

第二天

4. 在亮周期开始后 3 小时内选择阴道栓塞的雌性小鼠。

5. (大约在前一个暗周期中点后 16 小时)杀死选出的阳性小鼠，并将输卵管移到无菌培养皿中的 Whitten 培养液中。 培养液和培养皿应先在室温中平衡几小时。移到第二个含 Whitten 培养液的皿中洗涤。

6. 用钟表镊子拨开壶腹部(输卵管的透明膨出部)并取出被丘状卵膜环绕的卵泡细胞(已受精的卵或胚胎)。

7. 将卵丘/胚胎放在一滴置于 5cm 培养皿中间的透明质酸酶 50μg/ml 的 Whitten 培养液中。

8. 透明质酸酶将使卵丘解体，释放出胚胎 (5—10 分钟)。在解剖显微镜下观察卵丘的解体。在卵丘解体完成后，等待 5 分钟让卵的粘附性降低。

9. 用一根改造过的巴斯德移液管(将玻璃吸管置小火上并用手抻拉， 切成 4cm 长的小段，其末端内径为 0.5mm)。 用一橡皮吸头或一根带有管子的口吸吸头以控制管内液面的移动。

10. 在最小的体积内将胚胎依次转移过 4 个含 Whitten 培养液的培养皿。每次转移时要让胚胎散开，以洗去透明质酸酶及其它沾染物[注释(2)]。

11. 胚胎留置在最后一个培养皿中，在如第 12 步介绍的温室中保温，待用。

12. 温室(可以是一个厌氧菌瓶)调在 37℃。将室盖住并连续通入气体 (5%CO_2，先通过水以取得湿度)。在调试仪器时，胚胎置此可调节的环境中 5—10 分钟。

注射装置

13. a. 准备好一台带有相差干扰装置的倒置显微镜。在显微镜的两侧各放一台显微操作器(用定制的铝块将其垫到合适的高度)。全部装置都应固定到放置在石板块或其它稳重台面上的显微镜座上(并有合适的减振装置)。

b. 左侧的显微操作台用于夹持移液管，仪器的环部夹到厚壁的真空管上（内径 3.5 mm),真空管与一支 5ml 的 Hamilton 注射器相连并充满石蜡油(无气泡)。

c. 右侧的显微操作台控制注射。这台仪器的环部与一根连接可调节的压缩空气源的真空管相连。

d. 夹持移液管由铝硼硅酸盐毛细管制成,外径 1.5mm,内径 1.12mm。用垂直移液管抻拉器抻拉移液管,使其开口端的直径为 100μm,并在小火上略加热使其光滑[注释(3)]。

e. 以同样的毛细管在上述装置上制成注射移液管,将其外径拉到 1μm[注释(4)]。

14. 用清洁的口吸吸头及相连的管子稍加负压使 Whitten 培养液充满夹持移液管的一半(从前端)。在左侧的显微操作器以一橡皮垫圈封住夹持移液管。将夹持移液管尖固定在显微镜物镜上,对准移液管尖聚焦,并用显微操作器垂直向上提升移液管。

15. 用一根纤细的、手拉的玻璃毛细管[注释(5)]引导 0.5μl DNA(1μg/ml)溶液进入注射移液管平滑的后端。DNA 将由于毛细管作用吸到注射移液管的尖端。将 DNA 从毛细管中吸到吸管头中。尖端向上 2—3 分钟使 DNA 移到管尖。插入右侧显微操作器的环部,并用橡皮垫圈原地固定。

16. 用 Whitten 培养液将胚胎转移到一个皿中。滴一滴 Whitten 培养液到中间下凹型载玻片中间的孔中,并用一滴油盖住。将卵转移到此滴的一侧。

17. 将此载有胚胎的下凹载玻片在显微镜载物台上固定。降低两侧的移液管尖到含有胚胎的液滴中[注释(6)]。增高空气压力,使注射移液管中达到约20PSI[注释(7)]。

卵的注射

18. 通过连接注射器的夹持移液管尖所给予的稍许负压，拣起将各个胚胎(仅那些受过精并具有可见的原核和极体的)[注释(8)]。针对阳性原核聚焦,并使其处于胚胎的中心[注释(9)]。

19. 将注射移液管尖直接定位于原核上方,成直线。

20. 将注射移液管尖慢慢指向胚胎并进入原核,由于 DNA 被持续地从管尖排出，将可观察到原核胀大。

21. 一旦观察到这种膨胀,即刻小心地抽出注射移液管[注释(10)]。

22. 注射一组的全部胚胎。每个被注射完的胚胎移到液滴的另一侧。

23. 用洗涤移液管由下凹载玻片移去被注射的胚胎。

24. 置胚胎于一滴新鲜的 Whitten 培养液中洗涤,稍加振动。

25. 移出胚胎并置于一滴放在 10cm 塑料培养皿中间的 Whitten 培养液中。再将皿放到可调节环境的培养室中。

26. 卵已准备好,以备转移到代孕母鼠中。

卵移植到代孕母鼠中

27. 胚胎注射前一天，代孕母鼠与绝育(输精管结扎术)雄鼠交配。令9只雄鼠与27只雌鼠一起过夜。检查雌鼠的阴道栓塞(应该约有9只栓塞的小鼠)。

28. 用戊巴比妥麻醉假怀孕的母鼠[注释(11)]。

29. 通过动物的背切开暴露输卵管。用解剖显微镜。

30. 轻轻将卵巢和输卵管整理成形。用细镊子在卵巢囊上压一小印迹。

31. 转移移液管预先用同样的毛细管拉成，内径150—200μm，外径300—400μm，长8—10cm。一端在火上略烧使其光滑，从磨光的一端约1cm处做一45°弯曲。连接移液管与橡皮管和一个清洁的口吸吸头，用于精确地转移。

32. 小心地控制通到转移管上的气流，用少量的Whitten培养液将胚胎（每侧5—15个)转移到输卵管漏斗部。

33. 轻轻将卵巢重新置入体腔。缝合体壁和皮肤。

34. 在另外的子宫腔重复上述操作。

35. 将代孕母鼠回复到正常饲养，约在20天后生下幼鼠。

分析

36. 从幼鼠尾部取样分析基因组 DNA，将显示出插入 DNA（“转人基因”)在基因组中的存在(5-3、5-5、5-6)。如果调节顺序也被插入，特异性表型或表达 mRNA 的调节也是可能的。

注释

(1) 本操作中使用灭菌的塑料器皿和其它器件。

(2) 洗涤在室温下进行。为以后的操作所使用的 Whitten 培养液于37℃保存于一支灭菌的10ml塑料注射器中。

(3) 为方便起见，每种毛细管每次拉25支。

(4) 参见注释(3)。

(5) 使用同样的毛细管在明火上拉成。

(6) 调整夹持移液管的注射器，使稍有负压时无培养液从移液管中流进或流出。可能要经过一些实践才能良好地进行操作台的控制。

(7) 在整个操作中，持续的空气压力将把 DNA 液流从注射移液管的尖排出。

(8) 牢固地持住胚胎，但不要拉成桶状。

(9) 参见注释(8)。

(10) 因为注射移液管的直径不能精确地控制，可调节空气压力使之得到满意的 DNA 流量。

(11) 戊巴比妥的剂量是靠经验决定的。一般用2mg/ml的溶液，每克体重35μl。条件可以改变。

参考文献*

Brinster, R.L., Chen, H.Y., Trumbauer, M., Senear, W., Warren, R., and Palmiter, R.D., *Cell* 27: 223, 1981.

* 根据 T. Stewart 的操作程序，E. Sinn 博士提供本方法的细节。

Gordon, J.W., and Ruddle, F.H., *Meth. Enzymol.* **101**:411 1983.
Hoppe, P.C., and Pitts, S., *Biol. of Reproduction* 8:420 1973.
Mullen, R.J., and Whitten, W.K., *J.Exp. Zool.*, **178**:165, 1971.
Stewart, T., Pattengale, P., and Leder, P., *Cell* **38**:627 1984.
Whittingham, D.G., *J. Reprod. Fertil. Suppl.* **14**:7, 1971.

21-2 单克隆抗体的产生：杂交瘤融合

提要

这是一项有效地将建株的小鼠骨髓瘤细胞与产生抗体的小鼠脾细胞融合的技术，以分离产生抗体的克隆使得抗体产生得到放大。在每份稀释到单细胞后，使其克隆生长并筛选对特异性产物产生的抗体。本方法可产生足够进一步使用的量的高特异性的（单克隆的）抗体。

实验所需时间

从第一次注射到阳性克隆鉴定共需 4 个月

特殊装置

Coulter 计数器或其它细胞计数器
细胞培养设备(包括冰冻细胞用的液氮器，CO_2 培养箱及超净工作台)
12 道移液器

试剂

全部溶液需经 0.22μm 滤膜过滤灭菌
磷酸盐缓冲液（PBS）
NH_4Cl 缓冲液(配制 1 L)
Tris 碱（0.017mol/L）2.06g
NH_4Cl（0.1mol/L）5.87g
加水到 1L，调 pH 到 7.2
Dulbecco 改良的 Eagle 培养液（DMEM）
（Gibco；高葡萄糖）
HT-培养液
DMEM（高葡萄糖） 500ml
200mmol/L 谷氨酰胺(分装贮存于 －20℃ 备用) 6ml
HT 混合物(见下文)，100× 6ml
OPI 混合物(见下文)，100× 6ml
胎牛血清 50ml
庆大霉素贮存液（50mg/ml） 0.6ml
聚乙二醇-1000(50%)［PEG，见注释(4)］
HT 混合液(100×)

0.6805g 次黄嘌呤溶于 200 ml H_2O 中，加入大约 4 粒 NaOH 以使溶解（pH 约 10）

0.1937g 胸腺嘧啶溶于 200ml H_2O

混合上述两种溶液。加 H_2O 至 500ml,灭菌过滤,贮存于 − 20℃

100×氨基蝶呤

1.8mg 氨基蝶呤于 500ml 水中

加 1mol/L NaOH 至溶解

调体积至 100ml

灭菌过滤

− 20℃ 避光贮存

HAT 选择性培养基

100×氨基蝶呤 1ml

培养液 100ml

OPI 混合物(100×)

7.5g 草酸溶于 450ml 水中

加 2.5g 丙酮酸

胰岛素 1 000U,旋涡振荡下溶于 0.1mol/L HCl；加水至 500ml

每份 10—50ml,贮存于 − 20℃

完全与不完全福氏佐剂（Gibco）

BSA（V 级，Miles）

0.15mol/L NaCl，含 0.05% Tween-20

PBS，含 0.05% Tween-20 和 0.1mg/ml BSA

与碱性磷酸酶结合的羊抗小鼠 IgG（Cappel Co. 或 TAGO Inc.）

对磷酸硝基苯（Sigma）0.1mg/ml 于 10% 乙二胺中

方法

实验准备

用特定的抗原免疫小鼠。免疫过程取决于所用的抗原、它的有效性和纯度等等。免疫可用不纯的样品，因为被分离的单克隆抗体将直接针对一种单独的抗原决定簇。也可用整个细胞或膜来免疫,但筛选时则需纯抗原。

最好免疫 2 只(直至 10 只)小鼠,腹腔注射 25—1 000μg 与福氏完全佐剂为 1:1 制成乳化剂的抗原。一般说来，接着用抗原与福氏不完全佐剂 1:1 充分混合的抗原每隔 2—3 个星期注射 1 次,共 3 次作为加强。可用于鉴定抗原的每只小鼠所得抗血清的滴度或稀释度应用ELISA(见下文) 检查,而且稀释度至少要达到 1:2 000。含有多克隆抗体的血清可由尾静脉抽取,也可由眼眶取血,以建立筛选试验及测其滴度,像在动物上所做的一样。此时,用多克隆血清建立对阳性克隆强化筛选的方法,以决定其以后的可利用性。要用的小鼠在取脾脏前 3 天用抗原经静脉做最后一次加强。在免疫程序或筛选技术方面的变化,参阅本文所列出的参考文献。

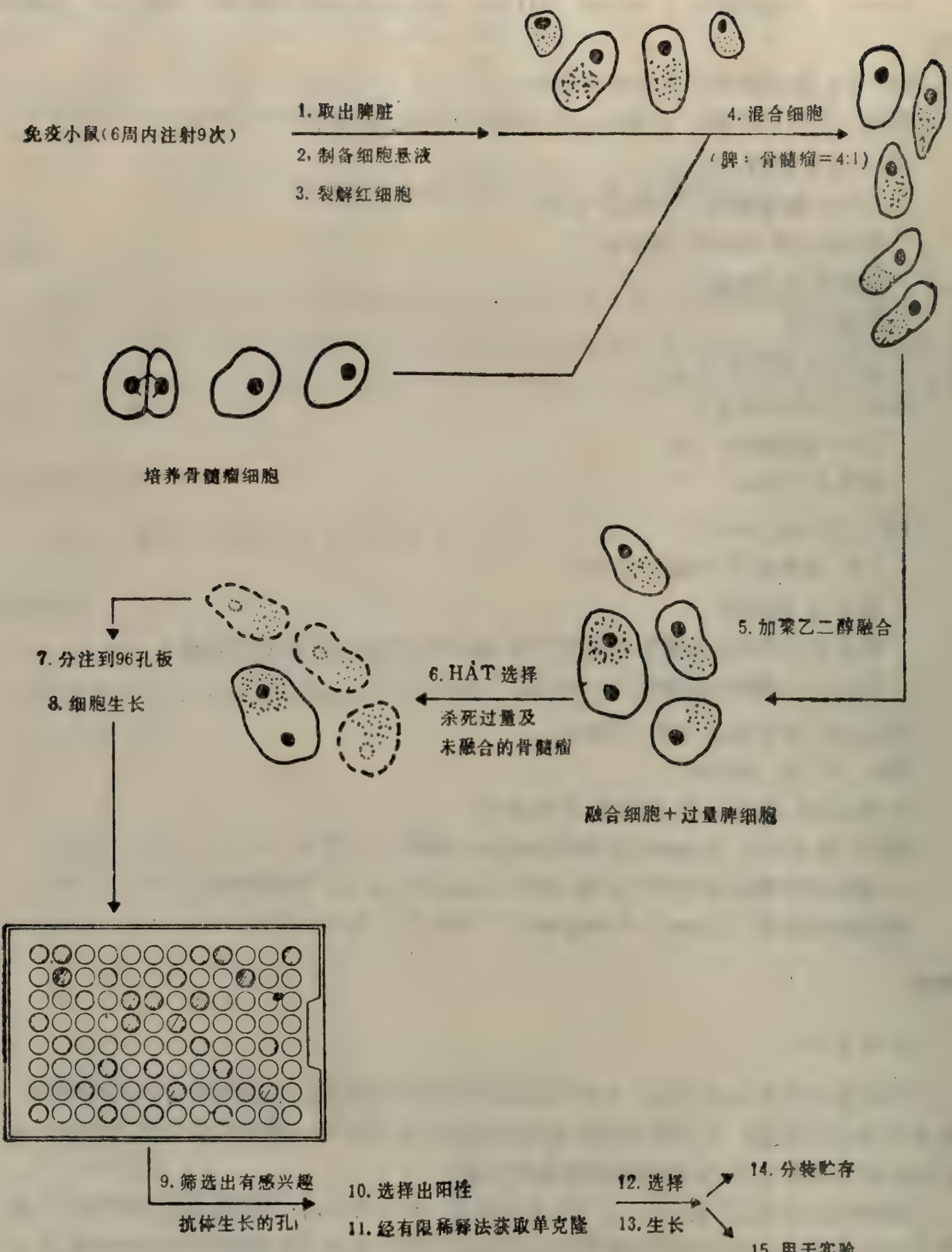


图 21.2 单克隆抗体产生的示意图。小鼠经感兴趣的抗原免疫。移出脾细胞并与快速分裂的骨髓瘤细胞融合。稀释后，对成功地融合了的细胞进行产生感兴趣的抗体能力的筛选。

ELISA 试验

已发展了各种筛选方法，但是我们感到酶联免疫试验（enzyme-linked immunosor-

bent assay, ELISA)在许多应用中都工作得很好。在一次典型的 ELISA 中，200μl 提纯的抗原（感兴趣的抗原）以 1μg/ml 溶于 PBS 中，放在 96 孔塑料板的每一个孔内（如 Costar）并 4℃ 放置 48 小时，然后轻轻振荡。每孔用 0.15mol/L 含 0.05% Tween-20 的 NaCl 洗。待评价的小鼠血清在含 0.05% Tween-20 和 0.1mg/ml BSA 的 PBS 中连续稀释(1:5)，至稀释度最高达到 1:5 000。每一稀释度的各份样品（200μl）各取双份加到预处理过的 96 孔塑料板上，以测定合适的滴度。同时，加入正常小鼠血清或免疫前的血清做为对照。板在室温下培养 1 小时，各孔按上述的方法洗涤。与碱性磷酸酶偶联的羊抗小鼠 IgG，典型的是 1:400 稀释（对每批样品，其稀释度须经验地加以测定）在含 0.5% Tween-20 的 PBS 中加到每个孔中。板再在室温下放置 1 小时，然后再用上述的方法洗各孔，加 200μl 显色基质对硝基苯磷酸盐。显色一般需用 1 小时，阳性孔即显黄色。阳性反应可用肉眼观察或用一台垂直光径分光光度计（或 ELISA 读数器）定量。

培养骨髓瘤细胞至对数期[注释(1)]。

1. 将骨髓瘤细胞置于 50ml 加盖试管中。

2. 无菌条件下取出其多克隆抗体滴度高于 1:2 000（根据 ELISA）的小鼠的脾脏。将脾脏移入一含 5ml 冰冷的无血清的 DMEM 培养皿中，培养皿置冰上。将脾脏用镊子压过 150 目金属网或尼龙网，直到形成单细胞悬液（约 10^8 细胞）。将脾细胞放在第二个加盖的 50ml 管中，在冰上放 5 分钟，此时细胞碎片沉于管底。将上清移入一新试管中。

3. 脾细胞和骨髓瘤细胞的试管都在 400×g 离心 5 分钟。吸出 DMEM，用 5ml DMEM 再洗细胞一次。

4. 加 10ml NH_4Cl 裂解脾细胞管中的红细胞。冰浴 8 分钟。慢慢用 DMEM 注满试管。

5. 在溶解红细胞的同时，用 50ml DMEM 重新悬浮骨髓瘤细胞。

6. 将骨髓瘤细胞管和脾细胞管 400×g 离心 5 分钟。从两根管中吸出培养液。

7. 在每根管中用 DMEM 重新悬浮沉淀至 25ml。

8. 对骨髓瘤细胞和脾细胞分别进行活细胞计数[注释(2)]。

融合细胞

9. 对全部体积的脾细胞加足够的骨髓瘤细胞，使脾:骨髓瘤的比例在 4:1 到 10:1 之间[注释(3)]。轻轻混合。

10. 混合细胞在 600×g 离心 10 分钟以形成坚实的沉淀。吸出全部上清液（注意：以下各步除离心外都在 37℃ 中进行）。

11. 轻轻敲打令沉淀物疏松，在 1 分钟内慢慢加入 1ml 50%PEG[注释(4)]，同时用吸管轻轻将沉淀物散开。

12. 用吸管尖再搅拌 1 分钟。

13. 加 1ml DMEM，搅拌 1 分钟以上。

14. 再加 1ml DMEM，搅拌 1 分钟以上。

15. 用 10ml 移液管慢慢在 7ml DMEM 中搅拌 2 分钟以上。

16. 室温下 600×g 离心 10 分钟。吸出培养液。

选择和筛选

17. 直接向沉淀上加 10ml HAT 选择性生长培养基。不要对沉淀用吸上吸下的方法进行混合。

18. 再加 HAT 选择性培养液，使每毫升含 10^6 细胞。稍等片刻至细胞分散。

19. 在 96 孔培养板上每孔加 100μl 细胞(每滴约 100 000 骨髓瘤细胞)。

20. 当滴加时，细胞团块沉于管中，当悬浮细胞被分配后，通过吸管上下吹打使细胞团块分散，然后将剩余的细胞和细胞团吸到另外的孔中。

21. 每孔加 55μl HAT 选择培养基(用 12 道移液管)。

22. 37℃ 5%CO_2 中将板培养 4 天[注释(5)]。

23. 小心地移去培养液上的2/3(约 100μl)并向每孔的克隆加入 200μl HT培养液(无氨基喋呤)[注释(6)]。

24. 必要时，约 1 周加培养液一次，直至克隆形成。

25. 对那些在上清中呈黄色(由于生长造成的 pH 改变)的孔做特异性抗体产生的测试。筛选取决于起始抗原的性质和可利用性[注释(7)]。

26. 将每个阳性的克隆在一块新的 96 孔板上扩展成 5 个孔或放到 24 孔板上的一个孔内。给予营养并令其生长至黄色。再连续测试阳性率。

27. 在 25cm² 三角烧瓶中用 5ml HT 培养液扩展每个阳性克隆。

28. 尽可能快地冻存几小管。1ml 细胞在细胞冻结器(或慢慢地在液氮中)冻在 DMEM、10% 血清和 10% 二甲亚砜(DMSO)的溶液中，10^7 细胞/ml，贮存于 −70℃。

29. 用有限稀释法克隆。一直稀释到大约在 96 孔板上平均每 2 孔有一个细胞。因此每块板应有 30—50 个阳性孔。如果阳性孔超过此数，需再做有限稀释(更多的稀释)。统计学上，对原始克隆连续做 2—3 次有限稀释可保证它的单克隆性。

30. 生长并冻存阳性克隆。现在单克隆抗体可用做探针，检测感兴趣的抗原。

注释

(1) 小鼠骨髓瘤细胞是恶性的转化 B 淋巴细胞。因为它们与 B 细胞相似，使之有好的融合率。有一些药物敏感性骨髓瘤细胞系可买到。所用的细胞系应与被注射的动物相适应。我们主要用 SP 2/0 (American Type Culture Collection)，因为它不分泌自己的轻链，因此是十分稳定的克隆。也用 NS1，它制造 κ 轻链但并不分泌。这两种细胞都对氨基蝶呤敏感，所以未融合的骨髓瘤细胞系可在含氨基蝶呤的 HAT 培养液中被杀死。骨髓瘤细胞应常规地筛选对 HAT 的敏感性，因为它有可能被丢失。细胞生长在 HT 培养液中，并在用前应处于对数生长期。融合前的 3 天每天以 1:2 的比例分瓶。

(2) 用细胞计数器或 Coulter 计数器计数。活力可用台盼蓝排斥法测定：混合 1 滴台盼蓝与一份细胞。在显微镜下检查。活的细胞排斥染料，死亡的细胞是蓝色的。

(3) 脾细胞需要比骨髓瘤细胞多。

(4) PEG 加的时间、类型及量应由经验测定。我们发现 50% PEG 最好用；其它的人可能用不同的百分比和类型。为测定那种工作得最好，可进行“假融合”，即融合脾细胞和骨髓瘤细胞以检查融合率(30—50% 为好)。在PEG处理后，细胞变脆，在这一步骤定时也是十分重要的。

(5) HAT 培养液中的氨基蝶呤将在 24 小时内杀死未融合的细胞。我们用 4 天的时间以求保险。未融合的脾细胞将不分裂。因此在孔中生长的细胞将是融合的产物。在这些孔中的上清将变成中黄

色，说明活存细胞的生长。对黄色的孔进行测试。虽然这些孔有可能是单克隆的，但一系列的有限稀释（第 9 步）将进一步保证这样的结果。

（6）补加营养的方式是吸出每孔顶部的 2/3 液体，并换入新鲜的 HT 培养液（约 200μl）。

（7）筛选是取决于抗原、抗原的性质及使用的需要。这是抗体产生过程中最难的部分。筛选可用放射免疫试验（RIA）、ELISA 或功能试验。这些取决于抗原及可用的测试系统及产生的抗体的预定功能。筛选方法应在融合前即建立，典型的做法是放在对动物免疫的期间内进行。

参考文献*

Davis, L.G., Manning, R.W., Callahan, A.M., Wolfson, B. Baldino, F., Jr., and Toy, S.T., J.Neurosci. *Meth.* **14**:15, 1985.

Engvall, E., Meth. *Enzymol.* **70**:419, 1980.

Goding, J.W. (ed.), Monoclonal Antibodies: Principles and Practices. Academic Press, New York, 1983.

Kennett, R.H., McKearn, T.J., and Bechtol, K.B. (eds.), Monoclonal Antibodies. Plenum Press, New York, 1983.

Kohler, G., and Milstein, C., *Nature* **256**:495, 1975.

Oi, V.T., and Herzenberg, C.A. In: B.B. Mishell and S.M. Shigii (eds): Selective Methods in Cellular Immunology. W.H. Freeman, San Francisco, 1980.

Voller, A., Bidwell, D.E., and Bartlett, A., The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Borough House, Guernsey, England, 1979.

21-3 标记探针在组织切片上的原位杂交

提要

本方法可用于在完整的组织内，从某一区域和细胞的水平鉴定 mRNA. 约 25—50 bp 合成的寡核苷酸是理想的探针，因为这样的探针容易穿透组织，又对识别某种 mRNA 有充分的特异性。此类探针可设计为对某一特定的 mRNA 互补并具特异性，可区分开差别仅为 1bp 的 mRNA. 本方法已被证明在研究含多种细胞类型的组织时是有用的，例如对于脑，但也用于许多其它组织。本节中所介绍的方法是用于大鼠脑组织的，但如应用于其它的组织仅需稍加改变。本方法可用于特定组织或细胞中 mRNA 调节的研究。注意：应用本方法时需有管理动物的技能和对动物做灌流和解剖方面的知识。

实验所需时间

第 1 天：2 小时，用于灌流动物

第 2 天：6 小时，用于做组织切片、制备和杂交

第 3 天：4 小时，用于洗涤组织和准备放射自显影

特殊装置

恒冷箱、冰冻切片机或 Vibratome

灌流装置

---

* M. M. Kelley 和 M. C. Cohen 在私人通信中提供了本方法中的多处细节。

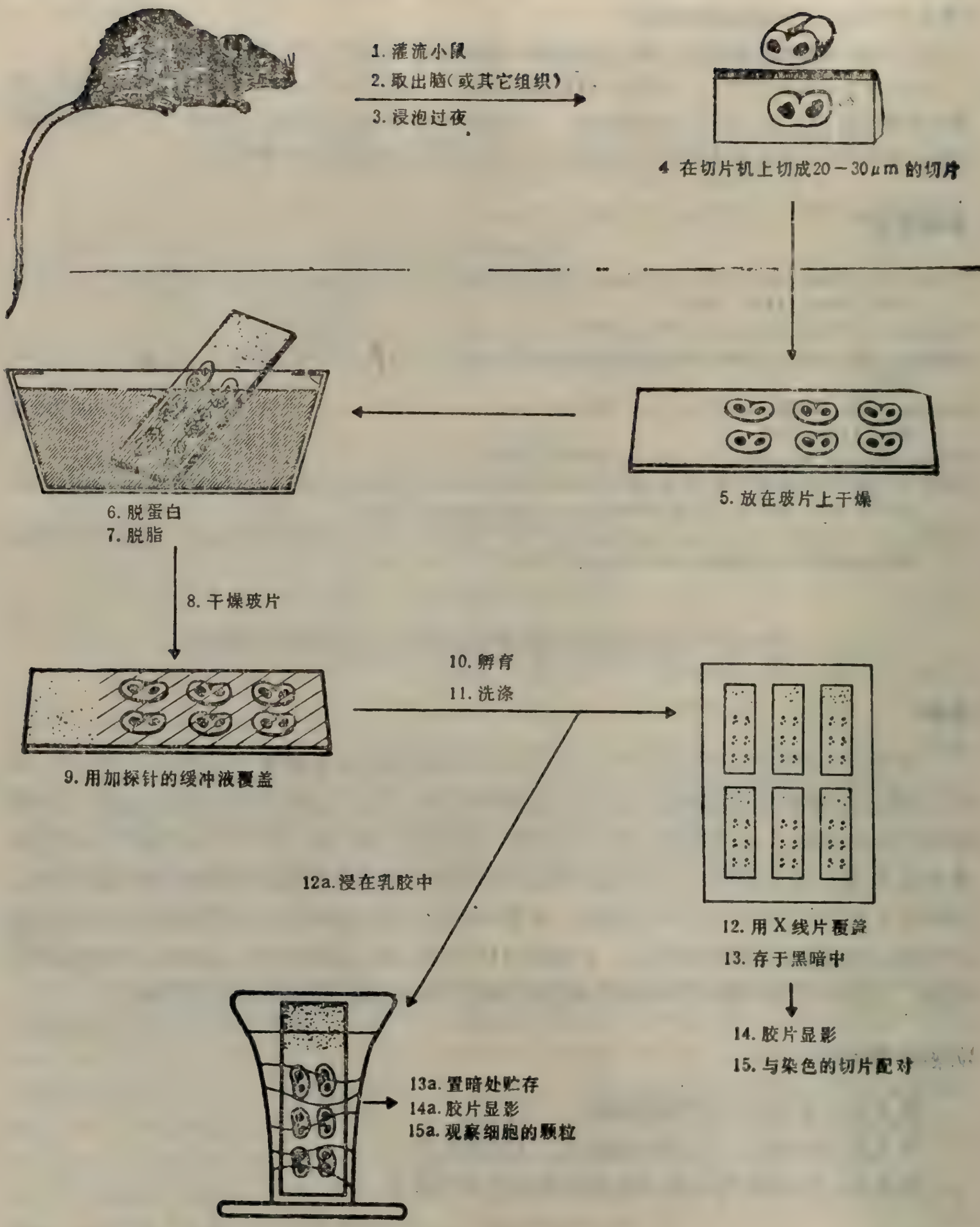


图 21.3 原位杂交。对被选择的组织(在本例中是脑)做切片并安放在显微镜载玻片上。切片要防止RNA分解，脱蛋白，脱脂，与放射性核苷酸探针杂交以测出感兴趣的RNA的存在。杂交的样品浸入乳胶中做细胞定位，或在胶片上进行放射自显影以做区域定位。

试剂

磷酸盐缓冲液（PBS）

4% 多聚甲醛，溶于 PBS 中

蔗糖

0.02%二乙基焦碳酸盐（Diethylpyrocarbonate, DEP 50μl 溶于 250ml 高压灭菌水中）

蛋白酶K混合物(配制100ml)

20mmol/L Tris, pH7.4

2mmol/L $CaCl_2$

蛋白酶 K, 1mg/ml

预杂交缓冲液

50% 去离子甲醛

0.1% 鲑鱼精子 DNA

2×SSC 缓冲液

10×Denhardt 溶液

0.1% SDS

乙醇(100、95、70 和 50%)

2×SSC 缓冲液

方法

实验的准备

用末端标记法对合成的 DNA 探针进行放射性标记(6-2)。标记的探针也可用其它方法产生(如来自 M13 的 DNA 或来自 SP6 的 RNA)。准备待用的载玻片[注释(1)]。

组织的准备

1. 用冷的 PBS(4℃)对麻醉的成年大鼠做心脏灌流至血液变清(5—20 分钟)，接着再用溶于 PBS 中的4%多聚甲醛灌流(约 20 分钟)[注释(2)]。

2. 取出脑。用溶于 PBS 中的 4% 多聚甲醛在 4℃ 固定 1 小时。在含 15% 蔗糖的 PBS 中 4℃ 培养过夜。

3. 将待用的显微镜载玻片置 0.02% DEP 中浸泡片刻，空气干燥。

4. 置液氮中将脑冷冻。对整个的脑或感兴趣的那部分做 5—30μm 厚的切片，切片在 －15℃ 的制冷台上或用冰冻切片机做。

5. 切片置载玻片上[注释(3)]。于载玻片下侧加温时小心地用毛刷将切片放平。

6. 玻片在 37℃ 下与蛋白酶K混合物培养 15 分钟[注释(4)]。

7. 依次在水中浸 2 次，然后置 DEP (由第 3 步)、50%、70%、95%和 100% 乙醇中各 5 分钟，然后再逆行此过程又回到水中。最后浸在 DEP 中以令组织脱脂。

8. 将玻片放在预杂交缓冲液中，室温中放 1 小时。

9. 配制杂交缓冲液。每张切片用 50μl。加入放射性探针，使每 50μl 预杂交缓冲液中含有 0.5—20×10^5cpm。从玻片上甩去预杂交缓冲液。加 50μl 含有探针的杂交缓冲液于每块切片上，并搅动之。

10. 置湿盒中并在一个水平的平面上放置过夜，温度为 4—45℃[注释(5)]。

11. 在室温或高一些的温度下用新鲜的 2×SSC 淋洗载玻片，每 15 分钟换一次，共进行3 小时[注释(6)]。

12. 空气干燥玻片。

13. 行放射自显影显示标记的区域。盖上清洁的塑料膜、 X线片 （XAR-5）及增感屏。－70℃ 曝光 3—7 天[注释(7)]。

注释

（1）待用载玻片的准备如下所述:

a. 载玻片在热的肥皂水中涮洗。再用水充分涮洗。

b. 在8%硝酸中泡 30 分钟。用水充分涮洗。令载玻片空气干燥。

c. 将 750ml 水加热到55℃。加入 1.87g 明胶至溶解。冷至室温，加 1.87mg 硫酸铬钾。

d. 使载玻片在上述溶液中慢慢浸泡 3 次。

e. 垂直晾干载玻片（不能有灰尘)。上述溶液 4℃ 下可放置一周，处理好的载玻片置不透气的盒子中可长久保存。

（2）在许多关于管理实验动物的教科书中都对灌流方法有介绍。 也可用其它的固定剂，如溶于 PBS 中的过碘酸盐-赖氨酸-多聚甲醛。对于某些组织，对未灌流的材料也可做固定。

（3）注意载玻片必须给予与样品一样的标志。标志不应溶于水或乙醇中。建议用铅笔。

（4）另一种方法是在室温下于 0.1mol/L HCl 中。

（5）温度是大概的。温度、SSC 浓度、甲醛在缓冲液中的百分比可根据探针的长度和需用的追切程度而改变(6-3)。如果探针短于 50bp，可能必须降低杂交的温度或甲醛的百分比。

（6）应用高压灭菌的玻璃器皿和无菌水，并戴手套以降低核糖核酸酶的污染。如果本底太高，可用更稀释的 SSC 缓冲液，或高温洗玻片，也可用较少量的探针重复实验。如果检测不出信号，则可增加放射性探针的浓度，或放射自显影较长的时间，也可用较高浓度的缓冲液(如用 4×SSC 缓冲液）杂交和洗涤。

（7）对细胞做定位研究，载玻片可浸于照相乳胶中(如 50% 稀释的 Kodak NTB2、NTB3 或 Ilford L4）并使乳胶显影。下列操作可用于将载玻片浸入乳胶的操作:

a. 在全黑的条件下(或钠蒸气安全灯下)，将 41℃ 的水与相等体积的 41℃ 的熔化的乳胶相混，将 Kodak NTB2 或 NTB3 做 1:1 稀释。避免引入空气泡。

b. 浸几片空白的载玻片在乳胶中以去除空气泡，并将载玻片拿到安全灯前检查乳胶混合物是否平坦。

c. 浸两块载玻片(背对背)到乳胶中去。慢慢取出载玻片，并将玻片的末端碰碰烧杯的外缘以去除过量的乳胶。

d. 将载玻片放在一垂直的架上(如铺一张吸水纸的液体闪烁测量瓶盘)，放在湿化的培养室中。在完全避光的条件下让乳胶干燥 2 个小时。

e. 将载玻片放在片盒中，盒中置干燥剂（如包装的 Drierite)。片盒的四周要封死防止漏光。4℃ 贮存 2 天到 8 周，时间的长短取决于 mRNA 的丰度和所用的同位素。

f. 将切片盒回复到室温。打开片盒。在 Kodak D19 显影液(1:1 稀释)中 16℃ 冲洗 2 分钟，接着在水中停显(10 秒)、固定(3 分钟，于 Kodak 快速固定液中)。水中洗 45 分钟。通过递增浓度的乙醇脱水，再接着用二甲苯。用 Permount 粘上盖玻片，置显微镜下检查。

参考文献

Angerer, R. C., Cox, K. H., and Angerer, L.M. In: Genetic Engineering, Volume 7 (J. K. Setlow

and A. Hollaender, eds.), Plenum Press, New York, 1985, pages 43—65.
Davis, L.G., Arentzen, R., Reid, J.M., Manning, R.W., Wolfson, B., Lawrence, K., and Baldino,F., Jr., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 83:1145, 1986.
Gee, C.E., and Roberts, J.L., *DNA* 2:157, 1983.
Lewis, M.E., Sherman, T.G.,and Watson, S.J., Peptides 6(suppl 2):75, 1985.
Wolfson, B., Manning, R. W., Davis, L.G., Arentzen, R., and Baldino, F., Jr., *Nature* 315:59, 1985.

21-4 在酵母中进行克隆繁殖

虽然充分讨论在酵母中进行克隆繁殖的方法超出了本书的范围，但谈谈有关这些方法的一般性问题是有用的。

在本书中谈到的哺乳动物细胞和细菌系统是被大多数分子生物学家广为应用的，而且对于大多数克隆繁殖的需要都是合适的。但是用酵母作为宿主和克隆繁殖载体却有某些优点。简而言之，酵母是易于管理的快速分裂的细胞，并具有许多真核细胞的分子属性。

本书中介绍的细菌宿主仅具有一个简单的基因组并具有良好的扩增作用和分泌的特性。但是细菌是原核细胞,不能行使某些在真核细胞所见到的功能。例如,细菌宿主细胞不能像真核细胞那样对蛋白质进行糖基化。再者,细菌细胞没有核,也不进行有丝分裂和减数分裂,使它们不适于在细胞周期中研究基因表达。

哺乳动物细胞可使克隆化基因在真核细胞中表达，但这些细胞有复杂的 DNA 基因组，不具备合适的扩增和微生物的选择性质。涉及到酵母的发酵在工业中已用了几个世纪。最近,生物技术工业转向酵母宿主细胞系统,为了生产在细菌系统中不可能生产的蛋白质产品。如果想在检查真核细胞 DNA 性质时利用在微生物宿主中工作的优点，使用酵母就可能有一定的优越性。

酵母宿主细胞也能用于研究特异性基因的表达、调节和功能。对这些实验来说,用酵母宿主细胞的优点在于有可能对酵母本身的等位基因进行特异性的变化。对哺乳动物细胞宿主，外源性DNA结构是随机地整合到基因组中去的。而在酵母则有可能用在实验室里经过改造的克隆化等位基因去代替基因组内的等位基因，因为外源性 DNA 的整合通常是经过同源性重组进行的。因此,新的基因可在它的正常的染色体环境中进行构造和检查。酵母的其它优点是它们易于生长、特征明确,并有很高水平的 mRNA。

应用酵母宿主系统也存在着潜在的局限性。没有可感染酵母的病毒，所以病毒载体不能用于酵母的转化。其它的局限性是，一般说来不容易切下酵母这种较高等的真核细胞的 DNA 中的内含子,这就使得在某些例子中不能对 RNA 有合适的加工及对蛋白质有正确的翻译。

分子生物学中最常用的酵母宿主是嗜糖性啤酒酵母。有许多质粒系统可用于酵母的克隆繁殖。这些质粒至少含有一部分大肠杆菌质粒,包括复制的原点和选择性标志。这就使得它们既能转化细菌又能转化酵母，因此称它们为穿梭载体。酵母整合的质粒（YIp）有能力进行自主复制,因此只有当同源重组入染色体后才能被保持。酵母复制质粒(YRp)含有酵母染色体 DNA，它能让质粒进行自主复制，来自酵母天然质粒的衍生物（YEp）比 YIp 提供高得多的转化频率。YIp 质粒每微克 DNA 仅产生几个转化体,而 YEp 和 YRp 产生转化体的数目可达到 10^2—10^5。典型情况下，YEp 和 YRP 质粒是不稳定的，

这有时是优点，另外一些情况下则又是缺点。YEp 质粒以高复本复制（如每个细胞约50)，因此可用以增加克隆基因的复本数。最后，YRp 质粒可携带酵母的着丝粒，在这样的情况下可在低复本的条件下稳定地被维持。

也可以通过同源重组的方式直接向酵母染色质中引入线性 DNA 片段。这可以在没有引入外来质粒的情况下进行。而且，通过这一方法，克隆 DNA 可引入到酵母中预定的、充分确定的染色体位点上。

像在其它系统一样，为调节插入 DNA 的表达，可在被克隆的 DNA 片段前添加可诱导的启动子。例如可加上 gal 启动子，这样在缺乏半乳糖时就能“关闭”，但在没有葡萄糖而有高水平半乳糖存在时（如 1 000 倍)则“开放”。再者，特异性的分泌的信号顺序可加入到插入 DNA 片段上。例如，交配激素 α 因子可有效地使蛋白质排出到培养液中。

人们已经比较了解酵母的遗传学特征，这就有可能借助类似的酵母基因的特异性突变的互补作用，利用酵母做为由异源性系统中分离和选择基因的宿主。同时，有时可由酵母中分离一个感兴趣的特定基因并用以做为分离其它种系中的有关基因的探针。

用于细菌宿主细胞的许多方法也可用于转化酵母细胞。涉及到对酵母做为宿主系统方法的总的评价，可参见下面引用的 Strathern 等的参考文献。

参考文献

Beggs, J.D., *Nature* 275:104, 1978.

Lewin, B. (ed), Gene Expression, Vol.2: Eukaryotic Chromosomes. John Wiley, New York 1980.

Spencer, J.F.T., Spencer, D.M., and Smith, A.R.W. (eds.) Yeast Genetics. John Wiley, New York, 1983.

Strathern, J.N., Jones E.W., and Broach, J.R., The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces, 2 vols. Cold Spring Harbor, New York, 1982.

（姚志建译　沈倍奋校）

附　　录

I. 贮存液

下面列出本手册各方法中所共用的贮存液，试剂和化学药品。在某些情况下将供应商列在化合物名称的后面，如酶和某些特殊的化学药品。通常列出的第一个名字是我们实验室惯用的。当然，这无非是一个初步的建议。某些供应商的地址汇编于附录 III。注意在本书各节的"试剂"部分中，用斜体(外文)和楷体(中文)字表示可直接从贮存瓶中取用的贮存液，用黑体字表示贮存液的稀释液。生长细胞的培养液被列在"培养基"栏下。每个方法的"试剂"部分注出了对贮存液的任何变动。一些贮存液被配制成浓缩的形式并被标明(如 10×或 100×)。注意在任何配方中使用的水都是去离子的水和蒸馏水。下面列出本手册中所使用的贮存液：

10mol/L 乙酸铵
10% 溴酚蓝
1mol/L $CaCl_2$
100 × Denhardt 溶液
鲑鱼精子 DNA，10mg/ml
1mol/L DTT
0.5mol/L EDTA
溴乙锭，10mg/ml
无离子的甲酰胺
凝胶加样缓冲液
1mol/L HCl
杂交缓冲液-N（缺口）
杂交缓冲液-S（合成）
100mmol/L IPTG
10×激酶缓冲液
10×连接酶缓冲液
培养液
　DMEM
　LB 琼脂
　LB 培养基
1mol/L $MgCl_2$
1mol/L $MgSO_4$
10×聚合酶缓冲液
RSB 缓冲液

3mol/L 乙酸钠

5mol/L NaCl

10mol/L NaOH

10% SDS

20 × SSC 缓冲液

20 × SSPE 缓冲液

SS- 苯酚

40 × TAE 缓冲液

20 × TBE 缓冲液

TE 缓冲液

TES 缓冲液

TMG 缓冲液

10% 三氯醋酸

2mol/L Tris, pH7.4

1% Triton X-100

酵母 tRNA 10mg/ml

10% Xgal 溶液

10% 二甲苯蓝

贮存液的配制

乙酸铵，10mol/L

385.4g 乙酸铵与 150ml 水混合，最后将体积补足至 500ml。

10% 溴酚蓝

溴酚蓝 5g 溶于 50ml 水中，室温保存。

$CaCl_2$ (1mol/L)

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 147g 溶解在 1L 水中，高压灭菌，室温保存。

Denhardt 溶液，100×

10g 聚乙烯吡咯 (PVP)

10g 牛血清白蛋白 (BSA)

10g Ficoll 400

加水至 500ml

过滤除菌，4℃ 下保存。用前混匀。

鲑鱼精子 DNA 10mg/ml 溶于水中；也可用 2mg/ml 和 5mg/ml 贮存液。用干净的剪刀剪下所要的量，并将溶液加压通过 23 号针头一次。贮存于 4℃ (Sigma，来源于鲑睾的 DNA 钠盐，III 型)。

DTT (二硫苏糖醇) 1mol/L 贮存液

3.09g 溶于 20ml 水中。分装后 － 20℃ 保存。

EDTA (乙二胺四乙酸二钠盐，0.5mol/L)

烧杯中放水 300ml，然后加入：

93.05g $EDTA-Na_2 \cdot 2H_2O$

充分混合,加 10mol/L NaOH 调 pH 至 8.0 (pH7 以前不溶),加水至 500ml。

溴乙锭溶液 (10mg/ml, 用于显示 DNA) 在 250—310nm 光激发下发射荧光。分子量 394.32。0.2g 溴乙锭溶解到 20ml 水中,混匀,在暗处保存(用棕色瓶或用箔将瓶子包上)。操作时要戴手套并避免吸入。

甲酰胺,去离子。50ml 甲酰胺加 5g 混合树脂 (如 Biorad AG 501-X8), 4℃ 下轻轻搅拌并两次通过 Whatman 1 号滤纸过滤。分装并在 －20℃ 保存。

凝胶加样缓冲液 (用于向凝胶加 DNA 样品)

配制试剂	10ml	终浓度
甘油	5ml	50%
40×TAE 缓冲液	250μl	1×
饱和的溴酚蓝	1ml	1%
二甲苯蓝 10% 悬浮液	1ml	1%
水	2.75ml	

通常配制 10ml,按 1ml 1 份分装,贮存于 －20℃。

HCl 1mol/L 贮存液

将 86.2ml 的浓盐酸加到 913.8ml 的水中,配制 1L。

杂交缓冲液-N (供缺口翻译探针用,配制约 800ml)

硫酸右旋糖酐 80g

水 300ml

甲酰胺(去离子) 320ml

20 × SSC 缓冲液 160ml

Tris, 2mol/L pH7.4 2.8ml

100 × Denhardt 溶液 8ml

鲑鱼精子 DNA (2mg/ml) 8ml

贮存于 －20℃,可用数月。

杂交缓冲液-S (供合成探针用,新鲜配制)

10% PVP (聚乙烯吡咯) 3ml

10% BSA 3ml

10% Ficoll 400 3ml

鲑鱼精子 DNA 贮存液 (10mg/ml) 2.2ml

20 × SSC 贮存液 15ml

酵母 RNA 250mg

加水至 150ml

IPTG (异丙基-β-D 硫代半乳糖吡喃糖苷)100mmol/L

23.8mg IPTG 溶于 1ml 水

激酶缓冲液，10×(配制 5ml)

0.5mol/L Tris pH7.4	2mol/L 贮存液 1.25ml
0.1mol/L $MgCl_2$	1mol/L 贮存液 0.5ml
50 mmol/L DTT	1mol/L 贮存液0.25ml
水 3ml	

连接酶缓冲液,10×(用于 T4 DNA 连接酶,配制 2ml)

Tris，0.5mol/L，pH7.4	2mol/L 贮存液 0.5ml
$MgCl_2$，0.1mol/L	1mol/L 贮存液 0.2ml
DTT，0.2mol/L	1mol/L 贮存液 0.4ml
ATP，10mmol/L	100mmol/L 贮存液 0.2ml
用 NaOH 调 pH 至 7.0	
BSA，50μg/ml	100μg
	加水至 2ml

培养基：也可参见使用培养基的各章节。

LB 琼脂(见 20-6)

950ml 水中加入：

10g bacto-胰蛋白胨(如 Difco)

5g bacto-酵母浸膏

10g NaCl

用 1mol/L NaOH 调 pH 至 7.4

加 15g 琼脂 (8g 为顶端琼脂)

加水到 1L

高压灭菌

必要时冷却至 50℃ 以后加抗生素

LB(Luria-Bertani) 培养基 (LB 肉汤;见 8-1)

向 950ml 水中加入：

10g bacto-胰蛋白胨

5g bacto-酵母浸膏

10g NaCl

用 1mol/L NaOH 调 pH 至 7.4

加水至 1L

高压灭菌

$MgCl_2$ (1mol/L)

20.3g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 溶于终体积为 100ml 的水中,高压灭菌。

$MgSO_4$ (1mol/L)

24.6g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 溶于终体积为 100ml 的水中,高压灭菌。

聚合酶缓冲液,10×(配制 10ml)

70mmol/L Tris，pH7.4	2mol/L 贮存液 0.35ml

500mmol/L NaCl　　5mol/L 贮存液 1ml
70mmol/L $MgCl_2$　　1mol/L 贮存液 700μl
水 7.95ml

RSB 缓冲液（Tris/NaCl/EDTA，配制 100ml）

10mmol/L Tris，pH7.4　　2mol/L 贮存液 0.5ml
10mmol/L NaCl　　5mol/L 贮存液 0.2ml
25mmol/L EDTA，pH7.4　　0.5mol/L 贮存液 5.0ml
水 94.3ml

乙酸钠（3mol/L）

40.8g NaAc · $3H_2O$ 溶于水中，终体积为 100ml，常在使用前用乙酸将酸碱度调到所需的 pH 值。

NaCl（5mol/L）

292.2g NaCl 溶于水中，终体积为 1L。

NaOH（10mol/L，小心操作）

200g NaOH 溶于 450ml 水中，混合，将体积补充到 500ml。

SDS（十二烷基硫酸钠，10%）

向盛有 100g SDS 的瓶中加水至 1L。整瓶使用，避免灰尘进入。

SSC 缓冲液(20×，配制1L)

NaCl，3mol/L 175.3g
柠檬酸三钠(含$2H_2O$)，0.3mol/L 88.2g
水 800ml
用 1mol/L HCl 调 pH 至 7.0
加水至 1L

SSPE 缓冲液 20×(用于噬菌斑的揭提)

NaCl(3mol/L) 175.3g
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$(0.2mol/L) 27.6g
ETDA-Na_2(0.02mol/L)　　0.5mol/L 贮存液 40ml
加水 800ml
加 10mol/L NaOH，调 pH 至 7.4
加水至 1L
高压灭菌，在高压时各种成分将完全溶解。

SS-苯酚(盐饱和苯酚)

454g 包装的苯酚(如 Mallincrodt)
2mol/L Tris 100 ml，pH7.4
水 130ml
小心地在 37℃ 下加热至苯酚溶解
移去上层水相
加入 100ml 2mol/L Tris，pH7.4
　　25ml 间苯甲酚(如 Kodak)

1ml β-巯基乙醇

500mg 8-羟基喹啉

水层和酚层一起在通风橱中室温保存。黄色苯酚溶液用于萃取。注意苯酚将处于贮存瓶中的顶层以便于移去。当用于提取 DNA 时，SS-苯酚一般是底部那一层。

TAE 缓冲液,40×

Tris 碱(1.6mol/L) 193.6g

$NaAc \cdot 3H_2O$(0.8mol/L) 108.9g

$EDTA\text{-}Na_2 \cdot 2H_2O$(40mmol/L) 15.2g

用乙酸调 pH 至 7.2

加水至 1L

TBE 缓冲液,20×

Tris 碱 (1mol/L) 121g

硼酸 (1mol/L) 61.7g

$EDTA\text{-}Na_2 \cdot 2H_2O$ (20mmol/L) 7.44g

加水至 1L

室温保存。如果在溶液中出现较多残渣应重新配制。

TCA (三氯醋酸)贮存液,10%

向有 500g 的 TCA 的瓶中加入 227ml 水,这将配制 100% TCA。稀释到 10%,用做工作贮存液。

TE 缓冲液 (Tris/EDTA)

Tris, 10mmol/L, pH7.4	2mol/L 贮存液 0.5ml
EDTA 0.1mmol/L, pH8	0.5mol/L 贮存液 20μl
	水 99.3ml

室温保存

TES 缓冲液

Tris 20mmol/L, pH7.4	2mol/L 贮存液 1.0ml
$EDTA\text{-}Na_2$, 0.1mmol/L	0.5mol/L 贮存液 20μl
NaCl 10mmol/L	5mol/L 贮存液 0.2ml

加水至 100ml

TMG 缓冲液

Tris 10mmol/L, pH7.4	2mol/L 贮存液 0.5ml
$MgSO_4$ 10mmol/L	1mol/L 贮存液 1ml

0.01% 明胶 10mg

加水至 100ml

Tris, 2mol/L, pH7.4

水 850ml

Tris 碱 242.2mg

HCl (浓) 75ml

慢慢并小心地加入浓 HCl,边加边搅拌,直至 pH7.4 (如需要不同的 pH, 相应地

调整 HCl 体积)。

加水至 1L

Trit on X-100，1%

1ml Trit on，加 99ml 水

酵母 tRNA 10mg/ml，在沉淀时作为 DNA 或 RNA 的载体。

10mg 溶于 1ml 水中

－20℃ 贮存于 1.5ml 微量管中

Xgal 溶液(5-溴-4氯-3 吲哚-β-D-半乳糖苷)，10%

100mg Xgal 溶于 1ml 二甲基甲酰胺（DMF）中

二甲苯蓝，10%

5g 二甲苯蓝，加水配制 5ml，每次分装前应重新悬浮。

II. 酶

AMV 逆转录酶（AMV reverse transcriptase），用于从 mRNA 模板合成 cDNA 的第一条链，例如在 λgt10 和 λgt11 的 cDNA 克隆繁殖中（Seikagaku America, Inc）。

BAL 31 核酸酶（BAL 31 nuclease），一种特异性地作用于双链脱氧核糖核酸的外切酶。降解双链的两个末端。催化反应时需要 Ca^{2+} 离子，并可被 EGTA 灭活（NEBL）。

DNA 聚合酶 I （DNA polymerase I），蛋白酶消化大肠杆菌。在缺口翻译中，作用于单链上的缺口处。也称 Kornberg 酶（BM）。

DNA 聚合酶 I，大片段（DNA polymeraseI, Klenow fragment）由蛋白酶消化大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 而产生。无 5′→3′ 的核酸外切酶活性。用于末端标记，M13 顺序分析和制做探针（NEBL BRL，IBI，BM）。

溶菌酶（lysozyme），从蛋清中获得。用于质粒的制备（P-L，Sigma）。

磷酸酶（phosphatase），冻干的小牛小肠（LCIP）。用于从 DNA 5′ 端去除磷酸残基。

链霉蛋白酶（pronase），一种非特异性蛋白酶（calbiochem）。

蛋白酶K（proteinase K），用于从细胞中分离大分子量 DNA。是一种无核酸酶活性的非特异性丝氨酸蛋白酶（BM，Beckman）。

核糖核酸酶A（RNase A），一种不含脱氧核糖核酸酶活性的特异性地作用于 RNA 的核酸内切酶。贮存于－20℃（BM）。

核糖核酸酶H（RNase H），用于降解 DNA-RNA 杂化物的RNA部分。来源于大肠杆菌（BM）。

S1 核酸酶（S1 nuclease），来源于米曲霉（*aspergillus oryzae*）。降解 DNA-RNA 杂化物分子的单链部位。对双链 DNA 或 RNA-DNA 杂种分子没有作用。这是一个通常含锌的金属酶（BM）。

SP6 T3，T7 聚合酶（SP6 T3，T7 polymerase），一种对特定的启动子序列有高度特异性的、依赖于 DNA 的 RNA 聚合酶。用于 DNA 克隆的 RNA 转录合成。贮存于－20℃（Promega, Vector Cloning Labs, NEN）。

T4 多核苷酸激酶（T4 polynucleotide），用于合成的探针和 DNA 片段的 5′ 末端标记。

贮存在 −20℃ (BRL, P-L)。

T4 DNA 聚合酶 (T4 DNA polymerase), 用于"磨平"限制性片段末端的凹末端与凸末端。贮存在 −20℃ (BRL, IBI)。

T4 DNA 连接酶 (T4 DNA Ligase), 用于连接 DNA 片段。贮存在 −20℃。(NEBL, BRL, IBI)

末端脱氧核苷酸转移酶 (terminal deoxynucleotidyl transferase), 用于将核苷酸加到 DNA 的 3′ 末端。

限制性内切酶 (restriction endonucleases), 有许多供应商, 例如: NEBL, BRL, IBI, BM, and P-L。常见的例子包括: *Bam* HI, *Eco* RI, *Hin* cIII, *Hin* fI, *Mbo* I, *Sma* I。商业上可供应数以百计的限制性内切酶。这些都是在本书的实验中使用的。

III. 试剂和设备的制造厂商

下面将列出在本书各方法中所用试剂和装置的主要供应商。这决不是一份详尽的汇编,甚至也算不上是一份推荐的意见,只不过是列出我们实验室中所用的东西而已,但不妨将它做为开始定购时的参考。

电泳装置

Bethesda Research Laboratories (BRL)——各种装置和用品
Life Technologies, Inc.
P. O. Box 6009
Gaithersburg, MD 20877

Bio-Rad Laboratories, Inc.——各种装置和用品
2200 Wright Avenue
Richmond, CA 94804

Hoefer Scientific Instruments——装置
654 Minnesota Street
P. O. Box 77387
San Francisco, CA 94107

International Biotechnologies, Inc. (IBI)——各种装置和用品
P. O. Box 1565
New Haven, CT 06506

ISCO——电融合电源
P. O. Box 5347
Lincoln, NE 68505

LKB Instruments, Inc.——装置
9319 Gaither Road
Gaithersburg, MD 20877

Pharmacia, Inc. (P-L Biochemicals) (P-L)——装置和用品

800 Centennial Avenue
Piscataway, NJ 08854

酶及有关的试剂

Amersham, Incorporated——试剂和放射性标记化学制品
2636 South Clearbrook Drive
Arlington Heights, IL 60005
Beckman, Inc.——酶和试剂、抗体
2500 Harbor Boulevard
Fullerton, CA 92634
Bethesda Research Laboratories——酶和试剂、抗体
BioRad——酶和试剂、抗体
Boehringer Mannheim Biochemicals (BM)——各类试剂
7941 Castleway Drive
Indianapolis, IN 46250
Calbiochem——酶和化学试剂
Division of American Hoechst
P. O. Box 12087
San Diego, CA 92112
Cooper Biomedical——酶和抗体
1 Technology Court
Malvern, PA 19355
Du Pont NEN Research Products (NEN)——载体、成套试剂、放射性标记试剂、放射自显影
549 Albany Street
Boston, MA 02118
New England Biolabs (NEBL)——克隆繁殖载体、酶、试剂
32 Tozer Road
Beverly, MA 01915
Pharmacia/P-L (See above.)
Seikagaku America, Inc.——酶
9049 Fourth Street North
P. O. Box 21517
St. Petersburg, FL 33724
United States Biochemical Corporation (USB)——酶和试剂
P. O. Box 22400
Cleveland, OH 44122
Vector Cloning Systems——克隆繁殖载体、包装的抽提物和细菌菌株
3770 Tansy Street

San Diego, CA 92121

细胞、质粒和载体

American Type Culture Collection (ATCC)——各类培养的细胞

12301 Parklawn Drive

Rockville, MD 20852

Bethesda Research Laboratories——各类培养的细胞

Bio-Rad——各类培养的细胞

Boehringer Mannheim Biochemicals——各类培养的细胞

E. Coli Genetic Stock Center——贮存的细胞

Department of Microbiology

Yale University School of Medicine

310 Cedar Street

New Haven, CT 06510

International Biotechnology, Inc.——贮存的细胞

New England BioLabs (NEBL)——贮存的细胞

Pharmacia/P-L——贮存的细胞

Promega Biotec——克隆繁殖载体、包装的抽提物

2800 Fish Hatchery Road

Madison, WI 53711

Vector Cloning Systems——克隆繁殖载体、包装的抽提物

其它化学药品[1]

Aldrich——实验室化学药品

P. O. Box 2060

Milwaukee, WI 53201

Alfa Products——化学药品,包括氢氧化甲基汞

152 Andover Street

Danvers, MA 01923

Collaborative Research——肽类和有关核苷酸的产物

128 Spring Street

Lexington, MA 02173

Difco Laboratories——细菌培养用化学试剂

P. O. Box 1058A

Detroit, MI 48232

Fisher Scientific——实验室化学药品、滤膜、设备

711 Forbes Avenue

1) 也可参见前面列出的许多供应商。

Pittsburgh, PA 15219

Eastman Kodak Company——X线片、显影剂、化学试剂

343 State Street

Rochester, NY 14650

Mallinckrodt, Inc.——化学药品和试剂

Box 5439

St. Louis, MO 63147

FMC BioProducts——琼脂糖

5 Maple Street

Rockland, ME 04841

Schwarz Mann——实验室化学药品

56 Rogers Street

Cambridge, MA 02142

Sigma Chemical Company——实验室化学药品

P. O. Box 14508

St. Louis, MO 63178

特殊产品

Beckman——离心机

Scientific Instrument Division

Campus Drive at Jamboree Boulevard

Irvine, CA 92713

Charles River Breeding Labs——小鼠

251 Ballardvale Street

Wilmington, MA 01887

Costar——塑料器皿

205 Broadway

Cambridge, MA 02139

E. I. du Pont de Nemours (Sorvall)——离心机

Clinical and Instrumental Division

Bioresearch Systems

Biomedical Products Dept.

Wilmington, DE 19898

Eagle Ceramics——玻璃细粉

12266 Wilkins Avenue

Rockville, MD 20852

Falcon Labware——细胞培养塑料器皿

Becton Dickenson Labware

1950 Williams Drive

中科院植物所图书馆
S0011799

期 90.5.18.
来源 书展
书价 12.10
单据号 13012
开票日期 90.5.18.

Oxnard, CA 93030

GIBCO Laboratories——细胞培养基和血清

Life Technologies, Inc.

Chagrin Falls, OH 44022

Fredrick Haer and Company——毛细管

Brunswick, ME 04011

Kapak Corp.——加热可密封的塑料袋

9809 Logan Ave.

Bloomington, MN 55431

KC Biologicals——细胞培养基

P. O. Box 14848

Lenexa, KS 66215

Peninsula Laboratories, Inc.——肽类

611 Taylor Way

Belmont, CA 94002

Sarstedt——塑料试管

P. O. Box 4090

Princeton, NJ 08540

Schleicher and Schuell, Inc. (S&S)——滤膜

10 Optical Avenue

Keene, NH 03431

Spectrum Medical Industries——透析袋

60916 Terminal Annex

Los Angeles, CA 90054

VWR Scientific——普通实验室设备和用品

International Headquarters

P. O. Box 7900

San Francisco, CA 94120

Whatman, Inc.——滤纸

9 Bridewell Place

Clifton, NJ 07014

（郭燕捷译　姚志建校）

58.17
822
25356

分子生物学实验技术
1990

借者	还期	借者	还期
1990	6 7		
1990	6 8 20		
	066 1		

58.17
822

注　　意

1 借书到期请即送还。
2 请勿在书上批改圈点，折角。
3 借去图书如有污损遗失等情形须照章赔偿。

25356

京卡0701

ISBN 7-03-001596-7
Q·239
定　价：16·10　元
科技新书目：213-090